

**Hidrólisis enzimática e identificación de
galotaninos en el extracto de mango
(*Mangifera indica*)**

Marcos Israel Negrete Obando

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2015**

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Hidrólisis enzimática e identificación de galotaninos en el extracto de mango (*Mangifera indica*)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Marcos Israel Negrete Obando

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

Hidrólisis enzimática e identificación de galotánicos en el extracto de mango **(*Mangifera indica*)**

Presentado por:

Marcos Israel Negrete Obando

Aprobado:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de
Agroindustria Alimentaria

Raúl Espinal, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Hidrólisis enzimática e identificación de galotaninos en el extracto de mango (*Mangifera indica*)

Marcos Israel Negrete Obando

Resumen. En el mango, los taninos de predominancia son galotaninos de gran peso molecular (332-1,852 Da). Su detección y cuantificación es compleja ya que contienen distintas porciones de glucosa y esterificaciones de ácido gálico que dificultan su análisis. El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la hidrólisis enzimática empleando tanin-acil-hidrolasa (E.C. 3.1.1.20) comúnmente conocida como tanasa (Fase I) y evaluar el uso de cromatografía de exclusión por tamaño como un pre-tratamiento previo a hidrólisis enzimática (Fase II). En cada fase se usó un diseño completamente al azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo (0, 3 y 5 minutos). Se cuantificó y caracterizó los galotaninos usando cromatografía líquida-espectrometría (MS-LC). La hidrólisis realizada por tanasa degradó el 62% de los taninos de gran peso molecular convirtiéndolos en ácido gálico y galotaninos de menor peso molecular. La concentración de ácido gálico (AG) incrementó 16 veces durante el proceso enzimático hasta llegar a 8.23 mg AG/kg de extracto. Según el análisis de espectrometría, se clasificó a los galotaninos de bajo peso molecular como éster-digaloil glucosa y sus isómeros en posiciones *meta* y *para* en el anillo benceno del primer ácido gálico. En la segunda fase, el pre-tratamiento de exclusión por tamaño redujo el contenido de galotaninos de gran peso molecular (99%) y se identificó un nuevo compuesto (éter-monogaloil glucosa) no observado en la primera fase. Se recomienda continuar con estudios sobre el uso de cromatografía de exclusión por tamaño y la posible identificación de nuevos galotaninos de menor tamaño en mango.

Palabras clave: Cromatografía, exclusión por tamaño, tanasa, taninos.

Abstract. Mango contains tannins mainly gallotannins of high molecular weight (332 to 1,852 Da). Their detection and quantification is complex because they contain different portions of glucose and gallic acid esterification hindering analysis. The objective of the study was determine the effect of enzymatic hydrolysis using tannin acyl hydrolase (E.C. 3.1.1.20) commonly named as “Tannase” (Phase I) and evaluate the use of size exclusion chromatography column as a pretreatment before the enzymatic hydrolysis (Phase II). In each phase a completely randomly design (CDA) was employed with repeated measures in time (0, 3 and 5 minutes). The gallotannins were quantified and characterized using liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS). The hydrolysis by tannase degraded tannis of high molecular weight in 62% to gallic acid and gallotannin with the low molecular weight. The gallic acid concentration (GA) increased 16 times during enzymatic process to reach 8.23 mg AG/kg. According to spectrometric analyzes, gallotannins with low molecular weight were divided like ester-digalloyl glucoside and their isomers in the meta and para positions in the aromatic ring of the first gallic acid. In the second phase, pretreatment of size exclusion reduced gallotannins of high molecular concentration (99%) and identified a new compound (ether-monogalloyl glucoside) was no observed in phase I. It is recommended to continue studies on the use of size exclusion chromatography and the possible identification of new gallotannins smaller in handle.

Key words: Chromatography, size exclusion, tannase, tannins.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA.....	20
7. ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de tratamientos en el estudio de hidrólisis enzimática e identificación de galotaninos en el extracto de mango.....	3
2. Contenido de galotaninos en extracto de mango (mg eq de Mono-Galloil Glucosa por kg) durante hidrólisis enzimática.	7
3. Contenido de galotaninos en extracto de mango (mg eq de Mono-Galloil Glucosa por kg) durante la hidrólisis enzimática después del uso de la columna de cromatografía por exclusión de tamaño.....	15

Figuras	Página
1. Proceso propuesto de degradación de galotaninos por tanasa para la formación de éster di-galoil glucosa.....	8
2. Iones identificados en MS-LC del éster-digaloil glucosa para el galotanino C, iones en el primer cromatograma (A) e iones en el segundo cromatograma(B)	9
3. Cromatogramas de muestras analizadas al minuto 0 (A), 3 (B) y 5 (C) de la hidrólisis enzimática.....	11
4. Proceso propuesto de la degradación de galotaninos en la formación de isómeros de éster di-galoil glucosa, posición <i>meta</i> (A) y posición <i>para</i> (B). ...	13
5. Contenido de galotaninos totales en el extracto de mango después del uso de la columna de cromatografía por exclusión de tamaño.....	14
6. Iones identificados en MS-LC del éter-digaloil glucosa para el galotanino H, iones en el primer cromatograma (A) e iones en el segundo cromatograma (B).....	16
7. Cromatogramas de muestras analizadas al minuto 0 (A), 3 (B) y 5 (C) de la hidrólisis enzimática después del pre tratamiento.	17

Anexos	Página
1. Hidrólisis de ácido tánico catalizada por tanin acil hidrolasa.	23
2. Cuadro para la identificación de compuestos presentes en mango (Mangifera indica L.).....	24
3. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino A (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).	25
4. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino B (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).	26
5. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino D (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).	27
6. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino E (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).....	28
7. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino F (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).....	30
8. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino G (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).	30
9. Iones identificados en MS-LC de ácido gálico.....	31

1. INTRODUCCIÓN

Mango (*Mangifera indica*) es el cultivo más importante dentro de las frutas tropicales y subtropicales, esta fruta crece en más de 110 países alrededor del mundo y está íntimamente asociada con la historia de India (Radha y Mathew 2007). El mango es un cultivo muy antiguo que se plantó hace 4,000 años aproximadamente, pero el género *Mangifera indica* es originario del Sur Este de Asia (Litz 2009).

La producción y procesamiento del mango es una de las mayores industrias en muchos países. Además, la distribución y mercado de esta fruta ha llegado a ser una importante actividad económica internacional (Sinha *et al.* 2012). Los principales países exportadores de mango son India, Tailandia y México. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura) estimó que en el año 2014 se cosecharon alrededor de 28.8 millones de toneladas de mango (35% de la producción mundial de fruta tropicales) y las importaciones incrementaron en 1.4% totalizando 884,246 toneladas (FAO 2014).

De acuerdo a the National Mango Board, el precio del mango incrementó de diciembre, 2014 (\$6.22/caja de 10 unidades aprox.) a marzo, 2015 (\$7.91/caja de 10 unidades aprox.) el incremento fue de \$ 1.69 (NMB 2015). Este incremento se dio gracias al mantenimiento y mejora de la calidad en cada etapa de la cadena de producción de mango desde el campo al consumidor.

El mango es miembro de la familia Anacardiaceae y es una fruta climatérica con más de 50 especies diferentes, de las cuales sólo unas pocas se utilizan como fruto comestible (Paull y Odilo 2011). Su fruto es carnoso, su peso varía de 150 g a 2 Kg con forma ovalada y obtusa por sus extremos, su piel es de color que varía desde el verde, amarillo con tonalidades rojas o violetas donde recibe la luz directa del sol. Su pulpa es de color amarillo intenso y jugoso la cual es comestible (Litz 2009).

El mango es conocido con una excelente fuente de vitaminas como ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina y beta caroteno (Talcott y Talcott 2009). Además, el mango contiene fitoquímicos que son definidos como productos secundarios químicos de las plantas (Gil 2010). Existe amplia evidencia que acredita a los fitoquímicos en aportar beneficios en la salud. En el mango los fitoquímicos de predominancia son los galotaninos de gran peso molecular (332 a 1,852 Da) (Talcott y Talcott 2009).

Los galotaninos están compuestos por unidades de ácido gálico unidos a una molécula de glucosa por el grupo hidroxilo de glucosa (Álvarez 2011). Los galotaninos se encuentran en varias plantas, pero el prototipo que se ha identificado para iniciar la formación de los galotaninos es el pentagalloyl glucosa (β -1, 2, 3, 4, 6-Pentagalloyl-O-D-Glucopiranos) con un peso molecular de 940 g/mol y que pertenecen a los galotaninos hidrolizables (Hagerman 2002a).

Del pentagalloyl glucosa (PPG) se ramifican cadenas de ácido gálico formadas por enlaces depsídicos. Estos últimos enlaces son más fáciles de hidrolizarlos ya que posee un hidroxilo fenólico en lugar de un grupo hidroxilo alifático (Hagerman 2002a). Para degradar a los galotaninos en compuestos más pequeños se ha venido usando tanin acil hidrolasa (E.C. 3.1.1.20) conocida como tanasa cuya función es hidrolizar los enlaces que actúan sobre ésteres carboxílicos y depsídicos en los galotaninos produciendo ácido gálico y glucosa (Beniwal *et al.* 2013).

Las altas concentraciones de taninos en bebidas, como té helado, vino y con sabor a café pueden ocasionar la formación de precipitados formados por la interacción de los polifenoles con otras moléculas como proteínas (Lekha y Lonsane 1997). Estos efectos indeseables pueden ser reducidos o eliminados mediante tratamiento enzimático (Lekha y Lonsane 1997). El empleo de tanasa para degradar los taninos tiene un doble propósito, uno es eliminar los efectos indeseables causados por estos compuestos, incrementando la calidad de los productos y el segundo es liberar los monómeros de los polifenoles, conservando la capacidad antioxidante de los alimentos (Aguilar *et al.* 2010).

La cromatografía de exclusión por tamaño es un método cromatográfico donde la muestra se disuelve en la fase móvil y pasa por la fase estacionaria de consistencia de gel que se mantiene fija en la columna (Fuentes *et al.* 1998). El principio de separación se puede ilustrar al usar el gel Sepharose que consta de partículas pequeñas de sustancia hidrofílica e insoluble obtenidas al entrecruzar el polisacárido agarosa hasta formar cadenas polisacáridicas (Voet y Voet 2006).

La molécula de agarosa es altamente polar debido a su alto contenido de grupos hidroxilo aumentando el tamaño de la partícula del gel al contacto con el agua (Silva y García 2006). Las moléculas pequeñas de la muestra pueden penetrar dentro del gel mientras que las moléculas grandes de la muestra son excluidas más rápido porque no pueden introducirse en los poros del gel (Voet y Voet 2006).

La razón de este estudio fue evaluar la hidrólisis enzimática y el uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño como un pre tratamiento antes la de hidrólisis enzimática seguida a la identificación de galotaninos en extracto de pulpa de mango (*Mangifera indica*), fundamentándose en los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática por tanasa en el extracto de mango.
- Identificar compuestos después de la hidrólisis enzimática en el extracto de mango.
- Determinar el efecto de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño en el extracto de mango antes de la hidrólisis enzimática

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de fitoquímicos del Centro de Investigación de Frutas y Vegetales en el Departamento de Nutrición y Ciencia de Alimentos en Texas A&M University, College Station, Texas - Estados Unidos.

Diseño del estudio. Para el estudio de hidrólisis enzimática e identificación de galotaninos en el extracto de mango el experimento se dividió en dos fases, en cada fase se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). En Fase I se evaluó los tratamientos sin uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño en los tiempos de hidrólisis enzimática a cero, tres y cinco minutos (Cuadro 1). Se usó la separación LS MEANS para evaluar la interacción a través del tiempo durante la hidrólisis enzimática. En fase II se evaluó los tratamientos con el uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño en los tiempos de hidrólisis enzimática a cero, tres y cinco minutos (Cuadro 1). Se usó la separación de medias DUCAN para evaluar el efecto del uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño y LS MEANS para evaluar la interacción a través del tiempo durante la hidrólisis enzimática. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3®).

Cuadro 1. Descripción de tratamientos en el estudio de hidrólisis enzimática e identificación de galotaninos en el extracto de mango

FASE I			FASE II		
Columna	Hidrólisis (minutos)	Tratamiento	Columna	Hidrólisis (minutos)	Tratamiento
No uso	0	NC0	Uso	0	C0
	3	NC3		3	C3
	5	NC5		5	C5

Preparación del extracto de mango. Las muestras de mango de la variedad ataulfo se encontraban congeladas a -18°C empacadas al vacío con un mango maduro en trozos por bolsa, dichas muestras fueron enviadas por National Mango Board en el 2014. Las muestras se descongelaron en agua caliente a aproximadamente a 50°C por cinco minutos, los pedazos de mango fueron licuados por una licuadora de mano (HamiltonBeach®) con el objetivo de romper las paredes celulares del mango y dejar los compuestos químicos disponibles.

Se mezcló el puré de mango obtenido con metanol y acetona en proporciones 1:1:1 para solubilizar los compuestos en los solventes. Se dejó reposar por 30 minutos, para garantizar la mezcla de los compuestos químicos del mango con los solventes. Luego se filtró con gasa para separar la pulpa del mango de la mezcla de solventes y

compuestos químicos del mango. Se evaporaron los solventes en el evaporador rotatorio (Bunchi®Rotovapor II) para obtener los compuestos químicos del mango y el agua que queda en el extracto. Se realizó una segunda extracción utilizando la pulpa que quedo en la gasa en el proceso de filtración, se le adicionó metanol y acetona en proporciones 2:1:1 para realizar una segunda extracción, se dejó reposar 30 minutos, luego fue filtrado utilizando un embudo büchner con papel filtro FisherScientific® Q8 y una bomba de vacío. Se evaporaron los solventes en el evaporador rotatorio (Bunchi®Rotovapor II), se realizó una tercera extracción utilizando la misma pulpa usada en la segunda extracción y el mismo procedimiento. Finalmente, se mezcló el producto de las tres extracciones con el fin de obtener un solo extracto.

Purificación de taninos. La muestra obtenida de la extracción del mango fue purificada con el objetivo de obtener la fracción de taninos donde se usó el método de Sephadex LH 20 por Hagerman (2002). El método que indica Hagerman es muy usado para la separación de los taninos y no taninos fenólicos (Hagerman 2002b). Para ello se usó la columna de sephadex, que antes se equilibró con baños de etanol. La muestra de mango se cargó en la columna y se añadió etanol y metanol a la muestra (50:50 ml); se cargó la muestra en volúmenes pequeños en la columna y se añadió etanol, donde todos los compuestos fueron arrastrados a excepción de los taninos. Un vez se completó la elución de compuestos no taninos, se lavó la columna con 200 ml de acetona: agua (80% acetona: 20% agua, v/v) donde los taninos que fueron atrapados por la columna fueron recolectados. Este proceso usó una bomba de vacío para agilizar el proceso de purificación y el evaporador rotatorio (Bunchi®Rotovapor II) para separar los solvente empleados. Las muestras aisladas de taninos fueron almacenadas en refrigeración (5°C).

Solución enzimática. Se utilizó la enzima tanino acil hidrolasa, EC 3.1.1.20 de *Aspergillus oryzae*. Se elaboró el reactivo A siendo éste buffer citrato (50 mM) a 5.5 pH con 10.5 g de ácido cítrico en 800 ml de agua. El pH se ajustó a 5.5 con 1 N NaOH. Para obtener 3 U/ml de enzima se mezcló 1.2 g de la muestra liofilizada de la enzima con 200 ml del reactivo A. La muestra de la solución de enzima de tanasa fue almacenada en refrigeración (5 °C).

Hidrólisis enzimática. Se dividió la muestra de la extracción de mango en: una muestra para el proceso de la cromatografía de exclusión por tamaño que la finalizar dicho proceso se sometió a la hidrólisis enzimática. Mientras que la otra muestra paso directamente a la hidrólisis enzimática sin pasar por la columna de cromatografía de exclusión por tamaño. Se utilizó le enzima tanino acil hidrolasa, EC 3.1.1.20 de *Aspergillus oryzae* de la casa comercial kikkoman®, el producto se denomina Tannase-KTFH. Se siguió las recomendaciones de dicha casa comercial para asegurar el proceso hidrólisis.

Dichas recomendaciones óptimas de trabajo de la enzima son: 5.0-5.5 pH y 30 °C. La dilución de la enzima usada en el proceso de hidrólisis enzimática fue de 3 nano U/ml por 0, 3 y 5 minutos. Para detener la reacción en dichos tiempos se empleó calor y frio, para ello a cada muestra de cada tiempo se colocó en agua a 120 °C por 30 segundos y seguido en hielo por 30 segundos.

Columna de cromatografía de exclusión por tamaño. Se utilizó una columna de vidrio que en su interior se colocó el gel SEPHADEX CL-6B, este compuesto permaneció siempre húmedo y por ello se usó agua como efluente (fase móvil). Para su uso la columna fue lavada con agua para asegurarse que no existió ningún tipo de compuesto antes de cargar la muestra a separar. Para cargar la muestra se cerró el flujo de agua, se retiró el tapón y se colocó la muestra en la parte superior de la columna (5 ml). Una vez cargada la muestra se colocó el tapón retirado y se abrió el flujo de agua que permitió que la muestra atravesara por toda la columna de SEPHADEX CL-6B. La muestra al llegar al final de la columna fue recolectada en tubos de ensayo en volúmenes constantes de 15 ml con cada gota de la columna. Para mantener la estabilidad de las muestras obtenidas de la columna se añadió una gota de 0.1% de ácido fórmico en agua. Finalmente se consideraron los factores de tiempo y de dinero para escoger al azar una sola muestra para su análisis.

Caracterización y cuantificación de galotánicos con MS-LC. Todas las muestras fueron filtradas con un filtro de 0.45 μm y colocadas en viales de 1.5 ml para hacer analizadas. Se empleó Thermo Finnigan LCQ Deca XP Max MS con trampa de iones equipado con una fuente ESI (Electrospray). Las separaciones fueron en fase reversa usando a Finnigan Surveyor HPLC junto a un detector Surveyor PDS (detector fotométrico de llama). Las gradientes de separación fueron empleadas usando Kinetex Phenomenex® C18 (150 X 4.6 mm, 2.6 μm). Las inyecciones fueron realizadas dentro de las columnas usando 100 μL de la muestra. La fase móvil A fue metanol grado MS y la fase móvil B fue ácido fórmico al 0.1% a una velocidad de 0.4 mL/min. La gradiente A fue desde 0% de la fase B por 4.50 min y cambió a 5% de la fase B en 10 minutos, de 5 a 15% de la fase B en 18 minutos, de 15 a 30% de la fase B en 25 minutos, de 30 a 65% de la fase B en 35 minutos, de 65 a 85% de la fase B en 41 minutos se mantuvo a estas condiciones por ocho minutos antes de regresar a condiciones iniciales. La interface de electrospray trabajó en modo negativo. Todos los compuestos fueron cuantificados a 280 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I: Estudio del efecto de la hidrólisis enzimática usando tanin acil hidrolasa, EC 3.1.1.20 de *Aspergillus oryzae* a 3 nano U/ml en el extracto de mango sin el uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño.

La enzima al minuto cero degradó los galotaninos en ácido gálico. El contenido de ácido gálico aumentó a 0.53 miligramos de ácido gálico por kilogramo (mg AG/kg) presentando diferencias estadísticas ($P \leq 0.0001$) (Cuadro 2). Este efecto de aumento en el contenido de ácido gálico se debe a que la actividad de tanasa actúa sobre los galotaninos de forma secuencial donde la ruptura de los enlaces depsídicos en cadenas ramificadas de ácido gálico ocurre primero convirtiendo a los galotaninos en ácido gálico directamente (Beverini y Metche 1990).

Otro factor a considerar es la velocidad de una reacción catalizada por una enzima, la cual alcanza sus máximos niveles a pH y temperatura óptima (Voet y Voet 2006). Tanasa al alcanzar su máxima velocidad de reacción, se consideró que generó galotaninos de menor peso molecular (A, B, C, D, E, F y G) en pequeñas concentraciones con valores de 0.00 miligramos equivalentes de Mono Galoil Glucosa por kilogramo (mg-eq MGG/kg). Estas pequeñas concentraciones no pudieron ser detectadas debido a factores como la inyección de la muestra que es un paso crítico para el análisis cuantitativo ya que volúmenes de inyección muy pequeños del orden de μL influyen en la precisión de detección (Stashenko y Martinez 2009).

Al minuto tres, la enzima degradó a los galotaninos no únicamente en ácido gálico, sino también en un nuevo galotanino C, el cual aumentó su contenido a 0.70 mg-eq MGG/kg (Cuadro 2). La nueva aparición del galotanino C se atribuyó a que los galotaninos son degradados completamente por tanasa en ácido gálico y glucosa a través de compuestos intermedios de menor peso molecular siendo este el nuevo galotanino C (Ibuchi *et al.* 1972).

Cuadro 2. Contenido de galotaninos en extracto de mango (mg eq de Mono-Galloil Glucosa por kg) durante hidrólisis enzimática.

TR ¹ min	Compuesto	Tiempo (minutos)		
		0	3	5
12.4	Ácido Gálico ²	0.53 ³ ± 0.03 ⁴ b(z)	7.11 ± 0.11 ⁵ b ⁵ (y) ⁶	8.23 ± 0.11 ⁶ b(x)
20.9	Galotanino A	0.00 ± 0.00 ⁷ b(x)	0.00 ± 0.00 ⁸ c(x)	0.27 ± 0.05 ⁹ e(x)
21.2	Galotanino B	0.00 ± 0.00 ¹⁰ b(x)	0.00 ± 0.00 ¹¹ c(x)	0.59 ± 0.03 ¹² d(x)
22.4	Galotanino C	0.00 ± 0.00 ¹³ b(y)	0.70 ± 0.03 ¹⁴ c(y)	1.00 ± 0.04 ¹⁵ c(x)
23.6	Galotanino D	0.00 ± 0.00 ¹⁶ b(x)	0.00 ± 0.00 ¹⁷ c(x)	0.35 ± 0.02 ¹⁸ e(x)
24.9	Galotanino E	0.00 ± 0.00 ¹⁹ b(x)	0.00 ± 0.00 ²⁰ c(x)	0.29 ± 0.02 ²¹ e(x)
25.1	Galotanino F	0.00 ± 0.00 ²² b(x)	0.00 ± 0.00 ²³ c(x)	0.49 ± 0.04 ²⁴ d(x)
26.4	Galotanino G	0.00 ± 0.00 ²⁵ b(x)	0.00 ± 0.00 ²⁶ c(x)	0.59 ± 0.02 ²⁷ d(x)
34-45	Galotaninos	22.60 ± 1.46 ²⁸ a(x)	19.40 ± 2.30 ²⁹ a(y)	8.66 ± 0.16 ³⁰ a(z)
Coeficiente de variación		5.1%	10.4%	3.7%

¹Tiempo de retención. ²Contenido de ácido gálico expresado en mg de Ácido gálico por kg de mango. ³Media aritmética, ⁴Desviación estándar, ⁵Medias con letra diferente (a-e) entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05), ⁶Medias con letra diferente (x-z) entre filas indican diferencias significativas (P<0.05).

En base al orden en que la enzima hidroliza a los galotaninos siendo atacados primeros los enlaces depsídicos de la cadenas ramificadas de ácido gálico y por último los enlaces éster presentes en galotaninos (Beverini y Metche 1990). Se planteó la hipótesis que el galotanino C fue un éster-digaloil glucosa debido a su distribución de iones de masa-carga (m/z) durante sus cromatogramas (Figura 2). La distribución de iones en el segundo cromatograma fue similar al del éster-monogaloil glucosa reportado por Talcott y colaboradores (2014).

Al tener similar distribución de iones el galotanino C con el éster-monogaloil glucosa, se teorizó que el galotanino C posee la misma estructura que el éster-monogaloil glucosa pero añadido un ácido gálico. Si se toma en cuenta el peso molecular del galotanino C con un valor de 483 Da, el mismo está compuesto por una molécula de glucosa de 180 Da ramificada en el carbono seis con dos moléculas de ácido gálico de 340 Da la sumatoria para la molécula completa del éster-digaloil glucosa fue de 484 Da debido a se trabajó en modo negativo durante el análisis cromatográfico el valor reportado final fue de 483 Da. En la figura 1 se ilustra la posible degradación realizada por tanasa en los galotaninos para la obtención de éster-digaloil glucosa.

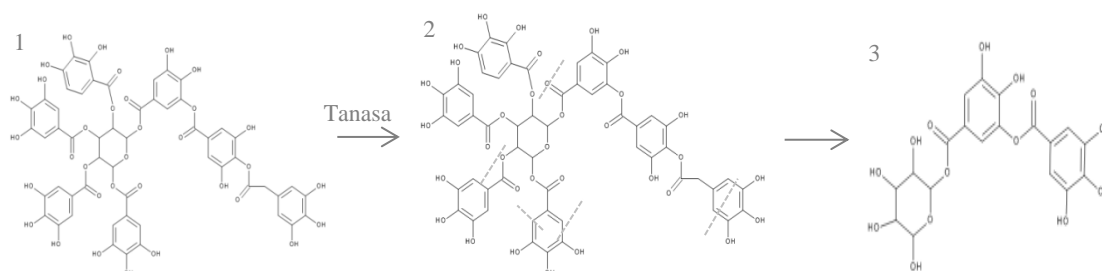


Figura 1. Proceso propuesto de degradación de galotaninos por tanasa para la formación de éster di-galoil glucosa.

La tendencia a aumentar el contenido de ácido gálico y disminuir los galotaninos se reflejó en el minuto tres, el ácido gálico aumentó a 7.11 mg AG/kg y los galotaninos disminuyeron a 19.38 mg-eq MGG/kg, ambos cambios presentaron diferencias significativas a través del tiempo ($P \leq 0.0001$) (Cuadro 2). Esto es debido a que tanasa es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces depsídicos y éster de los galotaninos produciendo moléculas de ácido gálico y glucosa (Ibuchi *et al.* 1972).

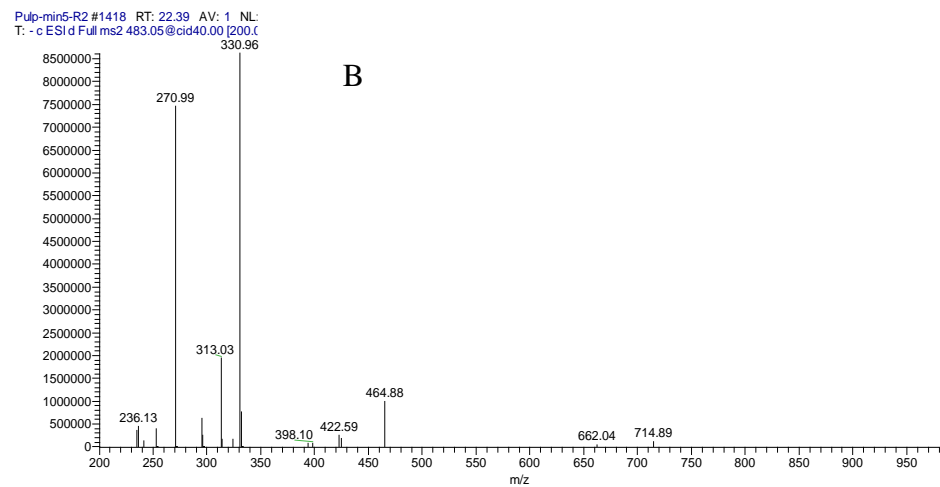
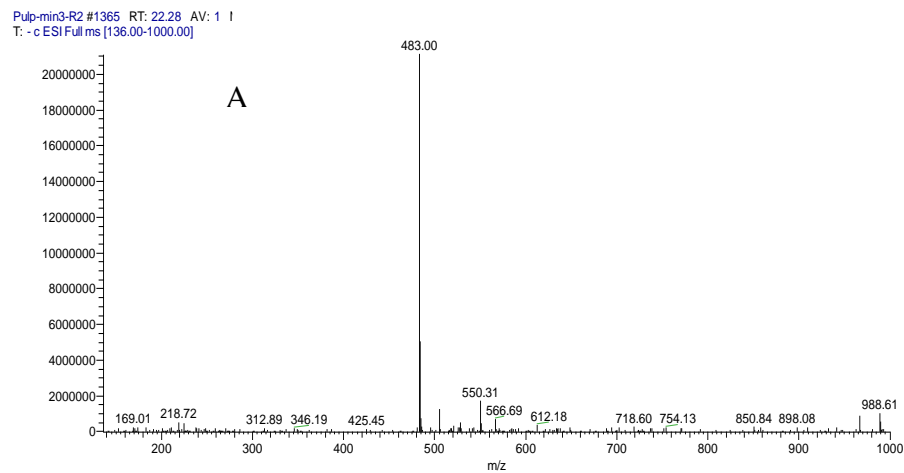


Figura 2. Iones identificados en MS-LC del éster-digaloil glucosa para el galotanino C, iones en el primer cromatograma (A) e iones en el segundo cromatograma (B).

La concentración de galotánicos de menor peso molecular (A, B, D, E, F y G) no presentaron cambios en su concentración en el minuto tres con un valor de 0.00 mg-eq MGG/kg ya que al tener menor peso molecular para tanasa fue más fácil hidrolizarlos. En general los compuestos de bajo peso molecular son más volátiles, solubles en agua y su degradación es más rápida a diferencia de los compuestos de alto peso molecular (Fernández *et al.* 2004). Estas características físico-químicas justifican la reducción mínima en la concentración de galotánicos de mayor tamaño a 19.40 mg-eq MGG/kg.

Se consideró también que el tiempo de incubación de la enzima influyó en la aparición del éster-digaloil glucosa ya que al transcurrir los tres minutos la enzima tuvo el tiempo suficiente para hidrolizar completamente a los galotánicos de menor peso molecular. La actividad enzimática se ve afectada por el tiempo de incubación ya que a medida que transcurre el tiempo de reacción enzimática ocurre también la aparición de productos intermedios que experimentan cambios generados por la actividad enzimática (Bárcena *et al.* 2013).

Finalmente al minuto cinco, la enzima degradó los galotánicos en nuevos compuesto de galotánicos siendo estos: A, B, D, E, F, G y junto al C que apareció en el minuto tres siendo este el único compuesto que presentó diferencias estadísticas dentro del minuto cinco ($P \leq 0.0001$) mientras para los demás compuestos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 2). Los tiempos de retención para los nuevos galotánicos (A, B, C, D, E, F y G) fueron 20.9, 21.2, 22.4, 23.6, 24.9, 25.1 y 26.4 minutos, respectivamente (Figura 3).

Se consideró que la duración del tiempo de incubación de la enzima influyó en la aparición de los nuevos galotánicos reportados al minuto cinco. La duración fue de dos minutos desde el minuto tres al cinco, en comparación de la hidrólisis que duró tres minutos desde el minuto cero al tres. Se consideró que tanasa al tener menor tiempo hidrolizó únicamente a los galotánicos de mayor peso molecular y no logró hidrolizar a los nuevos compuestos permitiendo observarlos al minuto cinco y no al tres donde tuvo mayor tiempo para la hidrólisis. La actividad enzimática se ve afectada por el tiempo de incubación ya que a medida que transcurre el tiempo de reacción enzimática ocurre también la aparición de productos intermedios que experimentan cambios generados por la actividad enzimática (Bárcena *et al.* 2013).

Para los galotánicos E y F no se logró una separación total de ambos compuestos ya que se registró un solo pico para el galotánico F a minuto 25.05 (Figura 3). Dentro de este pico se encontró el compuesto E, el cual no tiene un pico claro en el cromatograma. El motivo de una mala separación se debió a que el tamaño de las partículas y la homogeneidad de las mismas no permitieron una separación adecuada durante su interacción con la columna. Por lo tanto la velocidad de la fase móvil y el tiempo de análisis son factores a tomar en cuenta para futuros estudios (Sierra *et al.* 2010).

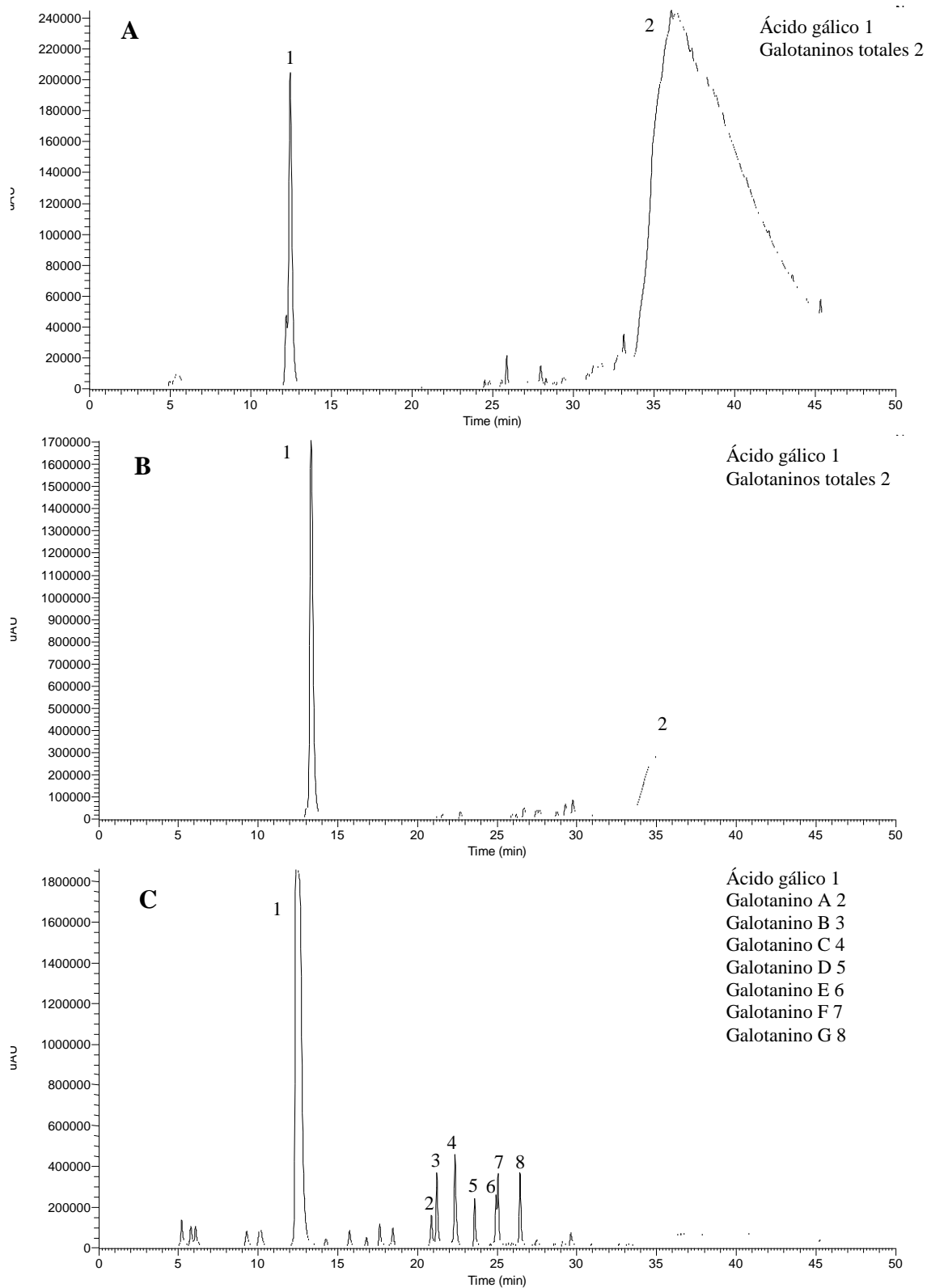


Figura 3. Cromatogramas de muestras analizadas al minuto 0 (A), 3 (B) y 5 (C) de la hidrólisis enzimática.

Basándose nuevamente en que la enzima hidroliza a los galotaninos siendo atacados primero los enlaces depsídicos de la cadenas ramificadas de ácido gálico y por último los enlaces éster entre las moléculas de glucosa y ácido gálico (Beverini y Metche 1990). Se planteó la hipótesis que para los compuestos A, B, D, E, F y G fueron isómeros del éster -digaloil glucosa ya que muestran similar fragmentación de iones con valores de 271 m/z. Este valor coincide con la fragmentación de iones del éster-monogaloil glucosa reportado por Talcott y colaboradores (2014).

Un sustituyente sobre el anillo bencénico puede afectar seriamente la reactividad del anillo (Weininger y Stermitz 1988). Considerando que las posiciones en la que puede posicionarse el segundo ácido gálico son *meta* y *para* del primer ácido gálico, en la figura 4 se plantea la posible degradación por tanasa sobre galotaninos de mayor peso molecular a los nuevos galotaninos. La isomería que tienen los compuestos químicos presenta la misma composición molecular pero diferente fórmula estructural proporcionando diferentes características físicas y químicas a los compuestos (Lafunte *et al.* 1997).

Se consideró que si el radical se sitúa en la posición **meta** el anillo bencénico es desactivado y mientras que si el radical se sitúa en la posición **para** el anillo bencénico es activado (Weininger y Stermitz 1988). Se consideró que cada isómero tiene diferente velocidad de degradación dependiendo de la posición **meta** o **para** que ocupe el segundo ácido gálico ramificado.

Se teorizó que para los compuesto A, D y E el segundo ácido gálico ocupó la posición **para** del primer ácido gálico ya que sus concentraciones fueron menores considerando que el anillo fue activado siendo un reaccionante para la hidrólisis. Mientras que para los compuestos B, F y G el segundo ácido gálico ocupó la posición **meta** del primer ácido gálico ya que sus concentraciones fueron mayores considerando que el anillo fue desactivado dificultando la hidrólisis por tanasa. Todos los compuesto A, B, D, E, F y G fueron isómeros de éster-digaloil glucosa pero con diferente posición del segundo ácido gálico.

La tendencia a aumentar el contenido de ácido gálico y disminuir los galotaninos se reflejó en el minuto cinco. El ácido gálico aumentó a 8.23 mg AG/kg y los galotaninos disminuyeron a 8.66 mg-eq MGG/kg, ambos cambios presentaron diferencias significativas a través del tiempo ($P \leq 0.0001$) (Cuadro 2). Este efecto se debe a que los galotaninos sufrieron rupturas causados por tanasa en los enlaces depsídicos entre los ácidos gálicos ramificados y además en los enlaces éster entre ácido gálico y glucosa (Bravo 1998).

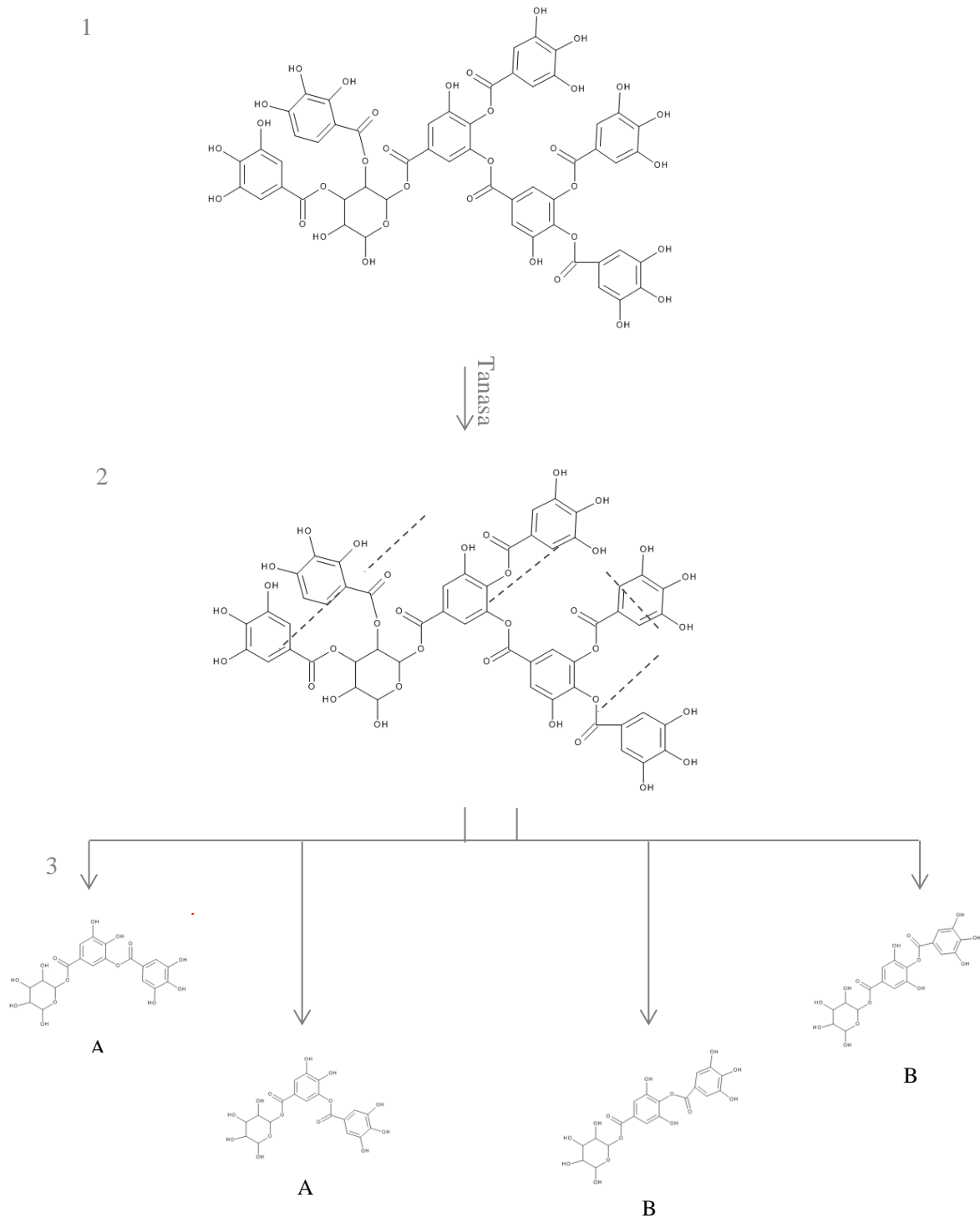


Figura 4. Proceso propuesto de la degradación de galotaninos en la formación de isómeros de éster di-galoil glucosa, posición **meta** (A) y posición **para** (B).

Fase II: Estudio del efecto del uso de la columna de cromatografía por exclusión por tamaño en galotaninos en el extracto de mango.

El uso de la columna de cromatografía por exclusión por tamaño presentó diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) en la reducción de galotaninos de mayor tamaño en el extracto de mango (Figura 5). En contenido se redujo de 46.83 a 0.51 mg-eq MMG/kg en el tubo analizado de la muestra. Esta gran reducción se debe a la permeabilidad selectiva del gel de la fase estacionaria en donde las moléculas de menor tamaño penetran y son retenidas por el gel y las de mayor tamaño se mueven junto a la fase móvil y salen con facilidad (Primo 2007).

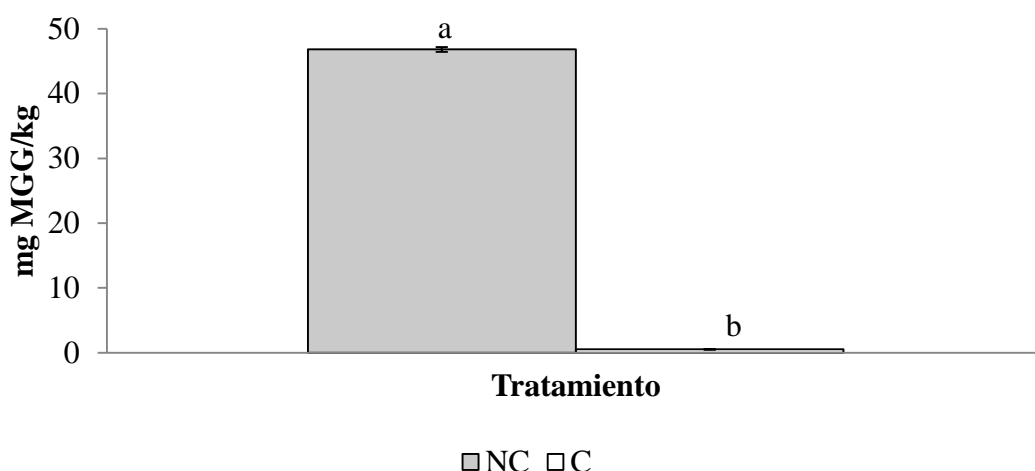


Figura 5. Contenido de galotaninos totales en el extracto de mango después del uso de la columna de cromatografía por exclusión de tamaño.

Este método permite separar la gran gama de compuestos presentes en el mango por tamaños moleculares haciendo que los galotaninos de gran tamaño fueran eludidos en los primeros minutos. Esto se atribuye a que las moléculas pequeñas presentes en la muestra penetran en los poros de las partículas de la fase estacionaria permitiendo que el tiempo de salida fuese mayor en comparación a las moléculas grandes que no penetran en las partículas de la fase estacionaria moviéndose junto al disolvente saliendo de la columna en un menor tiempo (Valcárcel y Gómez 1998).

El uso por primera vez de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño como un pre tratamiento en el extracto de mango permitió en esta fase del estudio identificar al minuto 28.83 un nuevo pico de galotanino siendo este el galotanino H que durante la hidrólisis realizada por tanasa en la fase I del estudio no se observó (Figura 7).

Para identificación del galotanino H, se consideró que al ser un compuesto de menor tamaño sus moléculas penetraron y fueron retenidas por el gel siendo eludido en el tubo analizado. Se planteó la hipótesis que el galotanino H fue un éter-digaloil glucosa debido a que la distribución de iones es similar a lo reportado por Talcott y colaboradores (2014), para el éter-digaloil glucosa con valores de 321 y 169 m/z (Figura 6).

El conocer el tipo de enlace con el que se unen el primer ácido gálico con la glucosa es importante para la biodisponibilidad humana. Estudios previos demuestran que los enlaces éster son susceptibles a la hidrólisis a altos pH como el ambiente del intestino y para los enlaces éter requieren la acción de β -glucosidasa (Brown *et al.* 1998). Explorar más a fondo el uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño en el extracto de mango ayudará a comprender la diversidad de nuevos compuestos en la realización de futuros estudios en diferentes variedades de mango que se comercializan actualmente.

Cuadro 3. Contenido de galotaninos en extracto de mango (mg eq de Mono-Galloil Glucosa por kg) durante la hidrólisis enzimática después del uso de la columna de cromatografía por exclusión de tamaño.

TR ¹ min	Compuesto	Tiempo (minutos)		
		0	3	5
12.4	Ácido Gálico ²	1.07 ³ ± 0.07 ⁴ b(y)	1.86 ± 0.05 ^{c5(x)6}	1.86 ± 0.05 ^{c(x)}
28.83	Galotanino H	0.36 ± 0.01 ^{b(y)}	0.00 ± 0.00 ^{b(x)}	0.00 ± 0.00 ^{b(x)}
Coeficiente de variación		2.4%	2.5%	2.5%

¹Tiempo de retención. ²Contenido de ácido gálico expresado en mg de Ácido gálico por kg de mango. ³Media aritmética, ⁴Desviación estándar, ⁵Medias con letra diferente (a-e) entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05), ⁶Medias con letra diferente (x-z) entre filas indican diferencias significativas (P<0.05).

En cuanto al efecto de la hidrólisis enzimática en el galotanino H, éste redujo su contenido de 0.36 mg-eq MMG/kg a 0.00 mg-eq MMG/kg al minuto tres y permaneció constante al minuto cinco donde la enzima hidrolizó totalmente a al galotanino H para aumentar el contenido de ácido gálico a 1.86 mg AG/kg al minutos tres y permaneció constante al minutos cinco dichos cambios presentaron diferencias significativas a través del tiempo (P≤0.0001) (Cuadro 3). Esto debido a que tanasa actúa sobre los galotaninos hidrolizando los enlaces entre los enlaces depsídicos formados entre las ramificaciones de ácido gálico primero, seguido de los enlaces éster formados entre la glucosa y el ácido gálico (Colombo *et al.* 2007).

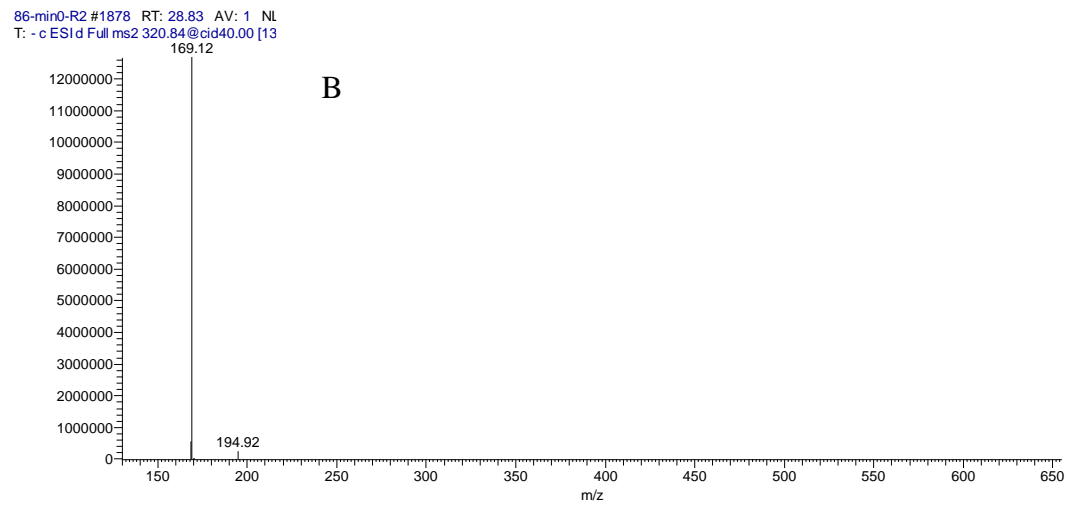
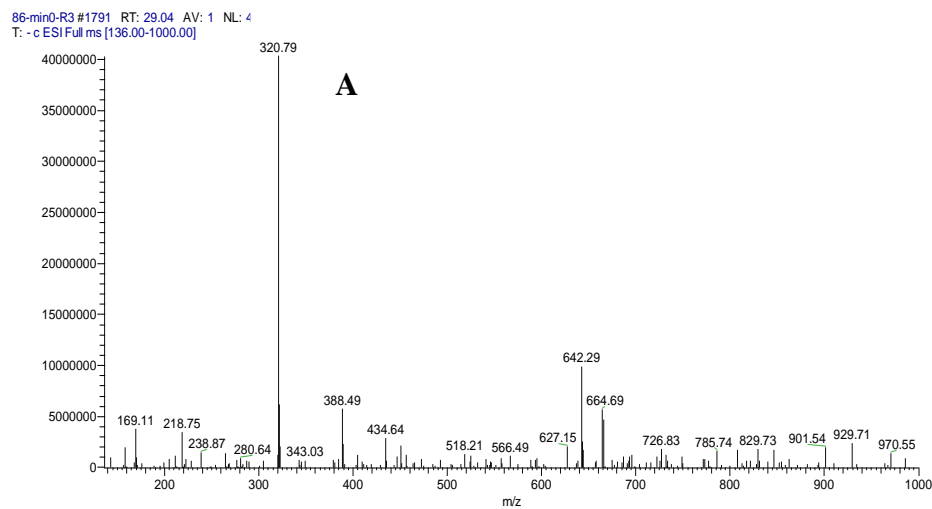


Figura 6. Iones identificados en MS-LC del éter-digaloil glucosa para el galotanino H, iones en el primer cromatograma (A) e iones en el segundo cromatograma (B).

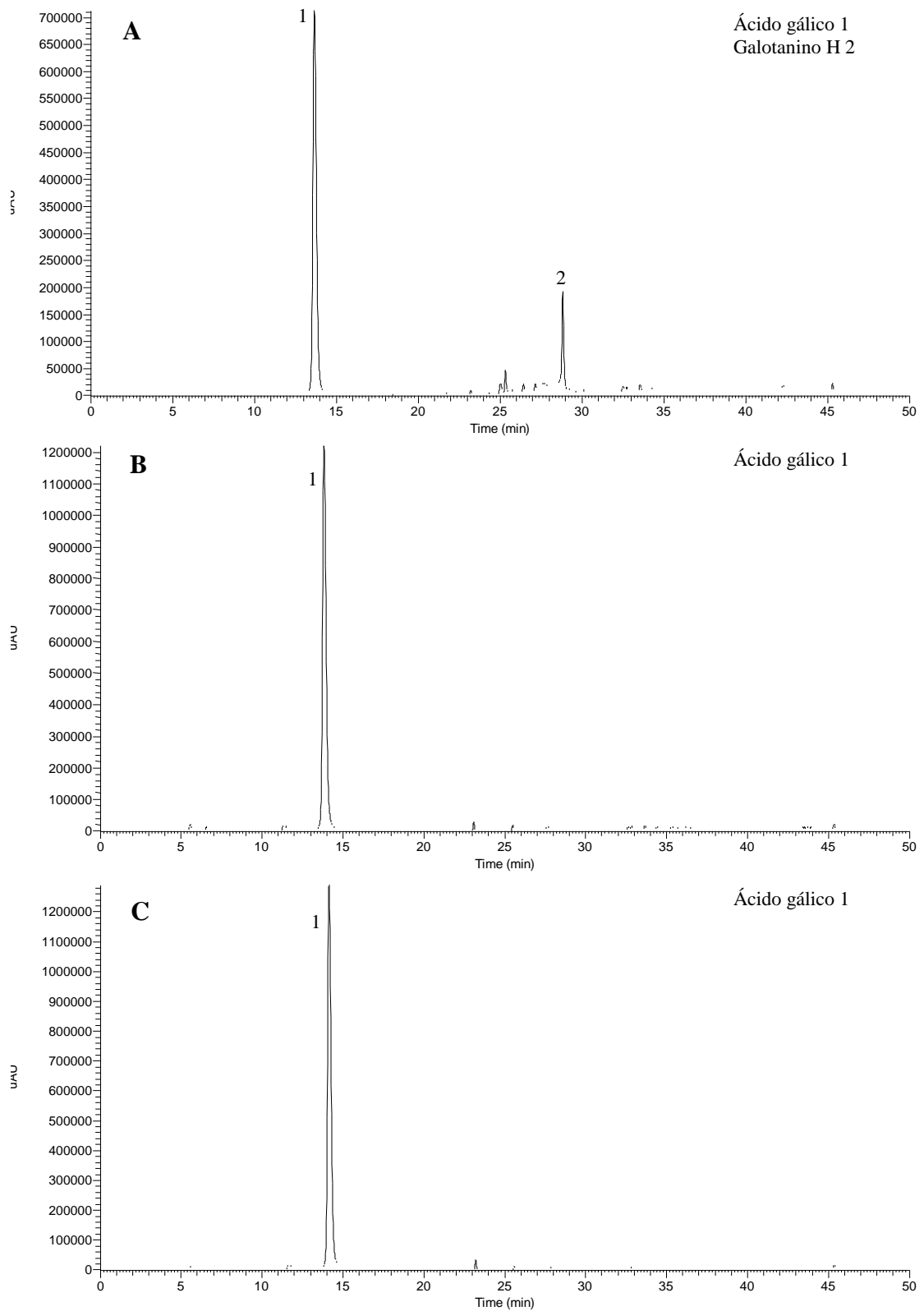


Figura 7. Cromatogramas de muestras analizadas al minuto 0 (A), 3 (B) y 5 (C) de la hidrólisis enzimática después del pre tratamiento.

4. CONCLUSIONES

- La tanasa presentó la tendencia a degradar los galotaninos de gran peso molecular en ácido gálico y en galotaninos de menor tamaño en ambas fases del estudio.
- En la fase I se identificó el galotanino C como éster di-galoil glucosa siendo el resto de compuestos isómeros del éster-digaloil glucosa donde los galotaninos A, D y E con ubicación **para** y los galotaninos B, F y G con ubicación **meta** para el segundo ácido gálico.
- En fase II se identificó el galotanino H como éter-digaloil glucosa el cual sólo se observó tras el uso de la columna de cromatografía de exclusion por tamaño en el extracto de mango.
- El uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño en la fase II redujo en 99% el contenido de galotaninos totales en el extracto de mango.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar en más detalle el uso de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño como pre tratamiento en extracto de mango en cada muestra eludida por la columna.
- Analizar la hidrólisis enzimática a los minutos uno y cuatro para conocer como actúa la tanasa actúa durante todo el proceso de hidrólisis enzimática.
- Evaluar este proceso con otras variedades de mango.

6. LITERATURA CITADA

Aguilar, C., Luís R., Blanca V., Juan C., Raúl R. 2010. QUIMICA Y BIOQUIMICA DE LA TANASA. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, (4): 355-359.

Álvarez, M. 2011. Taninos y Flavonoides. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador. 2 p.

Bárcena, J., Concepción, G., Carmen, P., Emilia, M., Jesús, D. 2013. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina. Universidad de Rabanales, Córdoba, España. 12 p.

Beniwal, V., Anil, K., Jitender, S., Vinod, C. 2013. Recent Advances in Industrial Application of Tannases: A Review. Maharishi Markandeshwar University, Mullana, Haryana, India. 1 p.

Beverini, M., M. Metche. 1990. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. Sciences des Aliments. 10: 808-816.

Bourvellec, C., Renard, M. 2012. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. Critical Reviews in Food Science and Nutrition (52):213-248.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews 56(11):317 – 333.

Brown, J., Khodr, H., Hider, R., Rice, C. 1998. A Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. Biochemistry Journal, (330):1173-1178.

Colombo, I., Alberto, M., Ordoñez., Isla, M. 2007. Microorganismos productores de tanasa (en línea). Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia UNT, San Miguel de Tucumán, Argentina. Consultado 31-08-2015. Disponible: http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=21024&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=745211

FAO, Food and Agriculture Organization. 2014. La producción mundial de fruta tropical alcanzará 82 millones de toneladas en 2014 (online). Consultado 01-28-2015. Disponible: <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/159358/>

Fernández, A., Mario, Y., José, C. 2004. Las Sustancias tóxicas persistentes. Instituto Nacional de Ecología (ed.) México. 179 p.

Fuentes X., Castiñeras, M., Queraltó, J. 1998. Bioquímica clínica y Biología molecular. Segunda edición, Barcelona, España. 163 p.

- Gil, A. 2010. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Segunda edición, Maria Dolores Ruiz (Coor.), Madrid, España. 169 p.
- Hagerman, A, 2002a. Hydrolyzable Tannin Structural Chemistry. Miami University Oxford, OH 45056. 1-5 p.
- Hagerman, A, 2002b. Protein Precipitation by Tannins. Miami University Oxford, OH 45056. 1 p.
- Ibuchi, S., Minoda, Y., Yamada, K. 1972. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *A. oryzae*. Agricultural and Biological Chemistry 36(7): 1553-1562.
- Krenek, K. A. 2009. HPLC and mass spectroscopic characterization of Mango (*Mangifera indica L.*) Gallotannins following enzymatic hydrolysis. Undergraduate Research Texas A&M University.
- Lafunte, L., Santiago, V., Maria Isabel B., Belén A. 1997. Introducción a la Química Orgánica. Castellón, España. 111 p.
- Lekha, P., Lonsane, B. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. Advances in Applied Microbiology (44): 215-260.
- Litz, R. 2009. The Mango: botany, production and uses. 2th edition, Preston, UK. 3, 4, 49 p.
- NMB, National Mango Board. 2015. F.O.B. Price Information Average per year (online). Consultado 03-10-2015. Disponible: <http://nmb-database.com/cropreports2/reportgenerateprice.php>
- Paull, R., Odilo, D. 2011. Mango. In: Paull, R. (ed) TROPICAL FRUIT VOLUME 1. 2nd edition. Wallingford, UK. 254 p.
- Primo, E. 2007. Química orgánica básica y aplicada: De la molécula a la industria. Tomo II, editorial REVERTÉ, S.A., Barcelona, España. 994, 1227 p.
- Radha, T., Lila, M. 2007. Fruit Crops. 3th edition, Peter, K. editor, New Delhi, India. 221 p.
- Stashencko, E., Jairo, M. 2009. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. Scientia Chromatographica 1(3):31-49.
- Sierra, I., Damián, P., Santiago, G., Sonia, M. 2010. ANÁLISIS INSTRUMENTAL. Ed. Lorena Bello, España. 140 p.
- Silva, M., Maria, G. 2006. Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria Del Instituto Catalán de la Salud. Editorial MAD, S.L. Sevilla, España. 321 p.

Sinha, N., 2012. Physiology and classification of fruits. In: Sinha, N., Jiwan S., Jozsef, B., James, W., Pilar, C. (ed) HANDBOOK OF FRUITS AND FRUIT PROCESSING 2th, Sidhu, Jiwan, Oxford, UK. 12 p.

Talcott, S., Susanne, T. 2009. Caracterización por Espectroscopia de Masas y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del Mango (*Mangifera Indica L.*) después de una Hidrólisis Enzimática. Final Report of Research for the National Mango Board. 1-5 p.

Talcott, S., Kimberly, K., Ryan, B. 2014. Phytochemical Composition and Effects of Commercial Enzymes on the Hydrolysis of Gallic Acid Glycosides in Mango (*Mangifera indica L. cv. Keitt*) Pulp. *Journal of agriculture and Food Chemistry*, (62): 9515-9521.

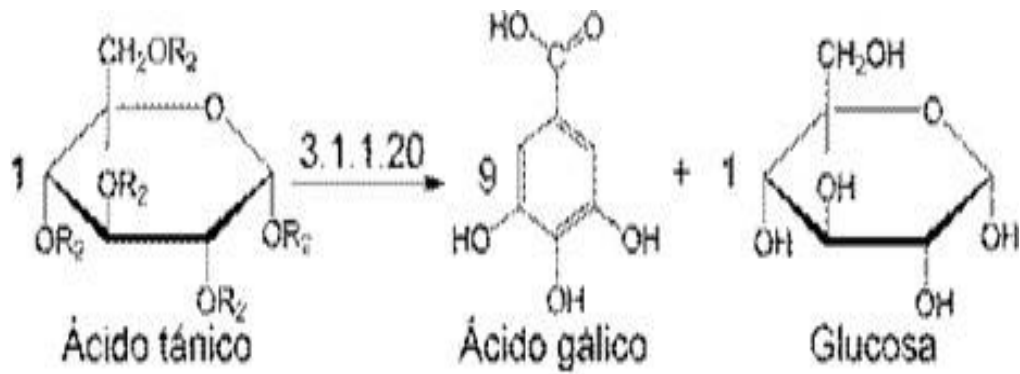
Valcárcel, M., A. Gómez. 1998. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté, S.A, Barcelona, España. 573 p.

Voet, D., Judith, V. 2006. Bioquímica. Trad. Rondinone, S. y Diana, K., 3era edición, Buenos Aires, Argentina. 144, 145, 492, 493 p.

Weininger, S., Frank, S. 1988. Química Orgánica. Ricardo Granados (trad.), Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 609 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Hidrólisis de ácido tánico catalizada por tanin acil hidrolasa.



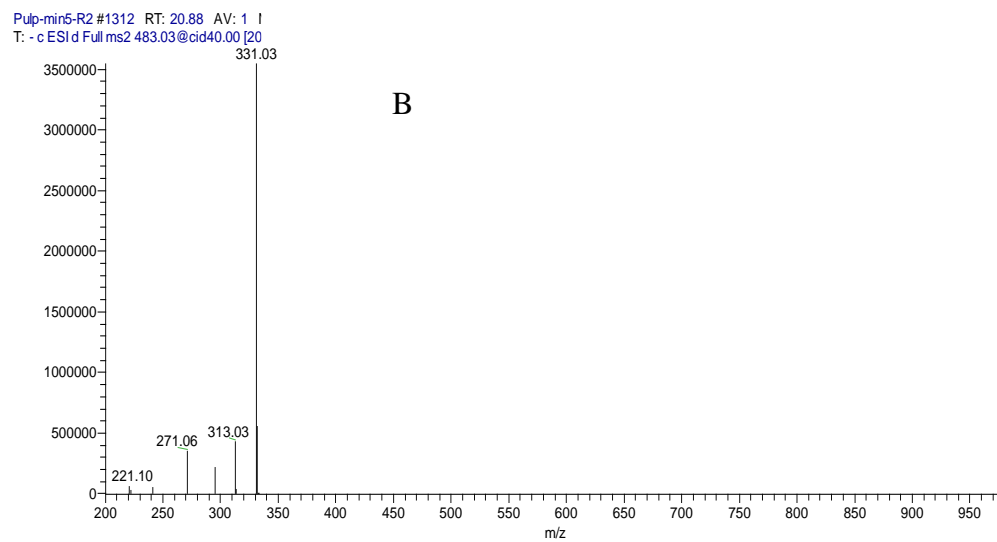
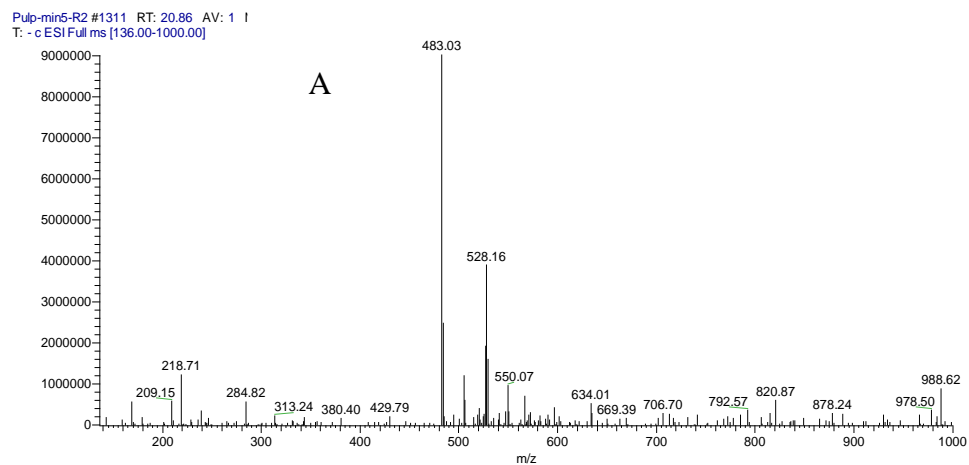
Fuente: Aguilar *et al.* 2010.

Anexo 2. Cuadro para la identificación de compuestos presentes en mango (*Mangifera indica* L.)

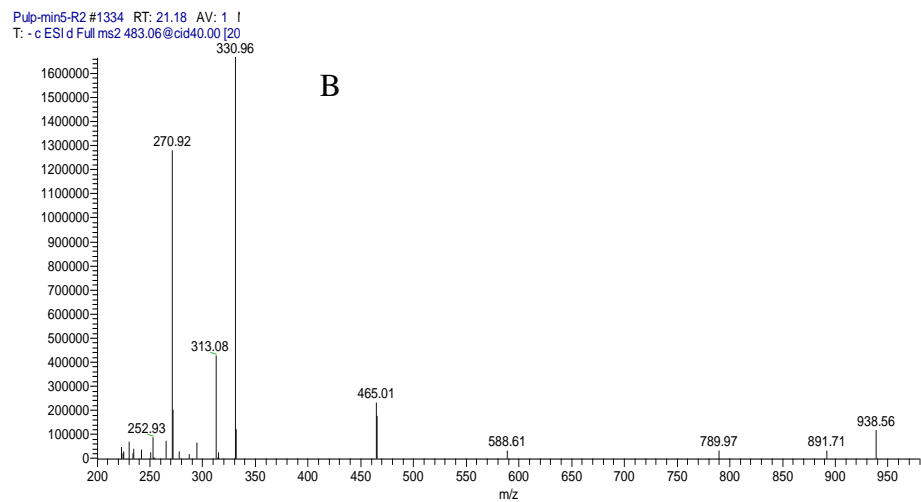
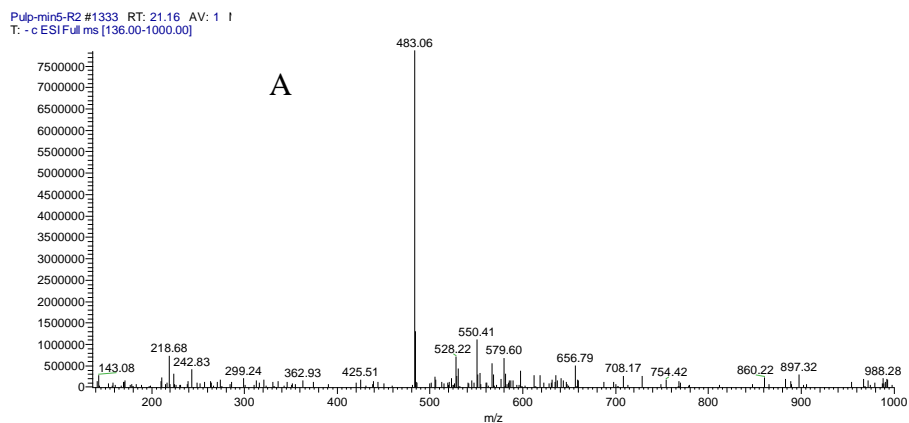
Peak No.	RT (min)	Compound	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z) ¹	Concentration (mg/kg) ²
1	21.67	ester ³ -mono-galloyl glucoside	278	331.2	271.1, 169.2, 211.2, 125.3	37.67 ± 0.56
2	24.55	gallic acid	271	169.2	125.3	1.74 ± 0.10
3	27.55	galloyl di-glucoside	274	493.1	313.22	0.45 ± 0.01
4	29.93	ether ³ -mono galloyl glucoside	254, 298	331.2	169.2, 125.4	3.82 ± 0.13
5	30.3	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid glycoside	256	299.1	239, 179, 137, 209	18.49 ± 0.72
6	35	coumaric glycoside	295	324.8	163.2	1.61 ± 0.05
7	36.52	dihydrophaseic acid glucoside	265	443.5	237.0, 219.1, 281.1, 425.3	2.60 ± 0.04
8	37.35	ferulic acid hexoside	290, 314	355	193.2, 149.3	0.91 ± 0.02
9	41.17	sinapic acid hexoside-pentoside	251, 283, 328	517.1	385.1, 205.3, 223.3	0.13 ± 0.01
10	41.42	sinapic acid hexoside	247, 327	385.1	223.0, 153.2, 205.3, 161.0	0.164 ± 0.01
11	43.93	dihydrophaseic acid glucoside	267	443.4	263.1, 219.1, 143.2	0.47 ± 0.03
12	44.55	hydroxy-dimethyl decadiene-dioic acid glucopiranosylester*	275	403.2	241.0, 343.0, 197.2	1.78 ± 0.09
13	46.22	hydroxy-dimethyl decadiene-dioic acid glucopiranosylester*	274	403.2	241.1, 343.1, 197.1	1.25 ± 0.13
14	48.23	abscisic acid glucoside	273	425	263.0, 219.2, 189.1	0.57 ± 0.02
15	52.02	eriodictyol- <i>O</i> -dihexoside*	277	611.4	449.2, 287.2, 389.1	Trace
16	52.62	eriodictyol- <i>O</i> -hexoside*	278	449.3	287.2, 389.1, 269.2, 227.1	Trace
17	61.98	abscisic acid	265	263.2	219.2, 153.2, 151.2	0.55 ± 0.04

Caracterización tentativa y semi-cuantificación de los compuestos presentes en pulpa de mango. var. Keitt (Krenek et al. 2009) 1 Ordenado por predominio de iones en el espectro. 2 Valores representan las medias y los errores estándar de tres repeticiones. 3 Designa el tipo de enlace glicosídico. * Identificación tentativa basada en las características espectrales y similitudes de fragmentación ESI-MSN.

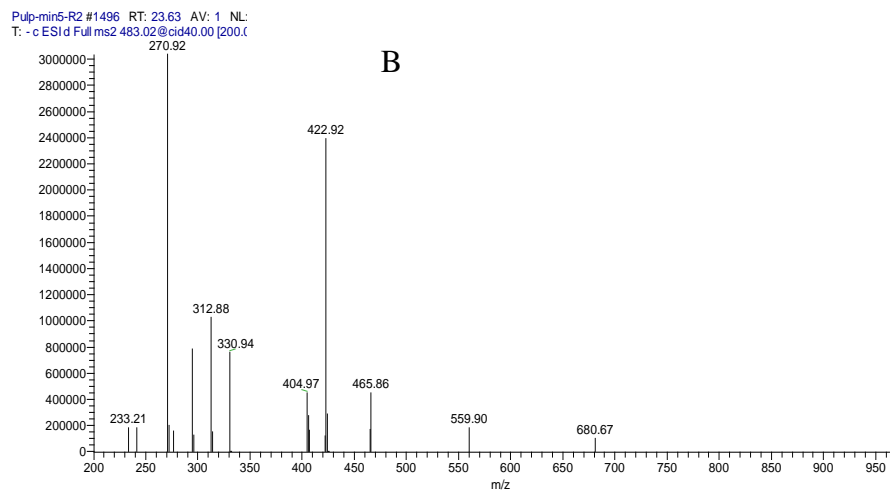
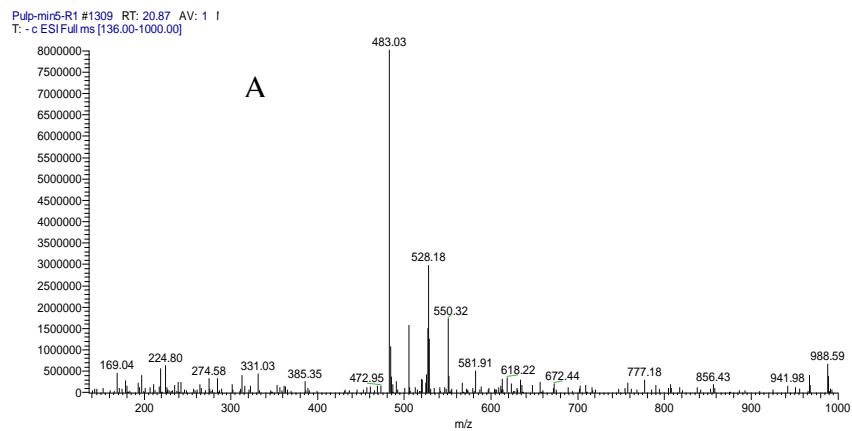
Anexo 3. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino A (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).



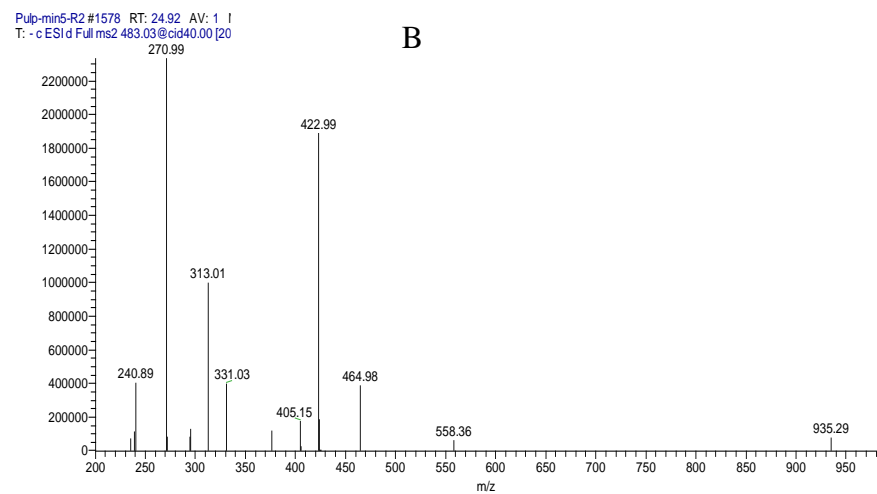
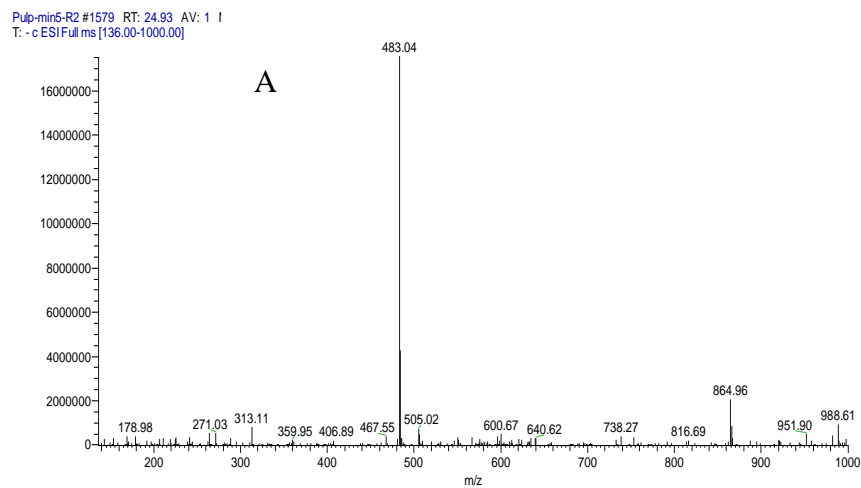
Anexo 4. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino B (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).



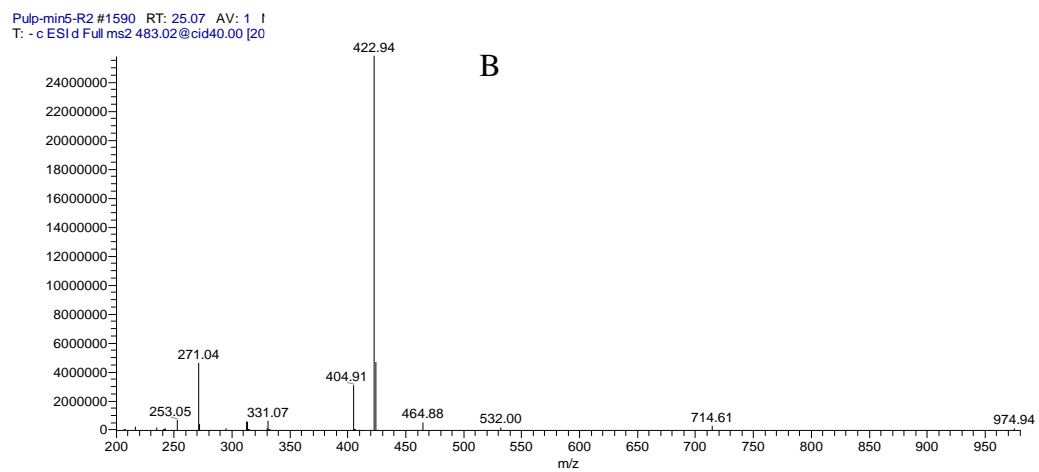
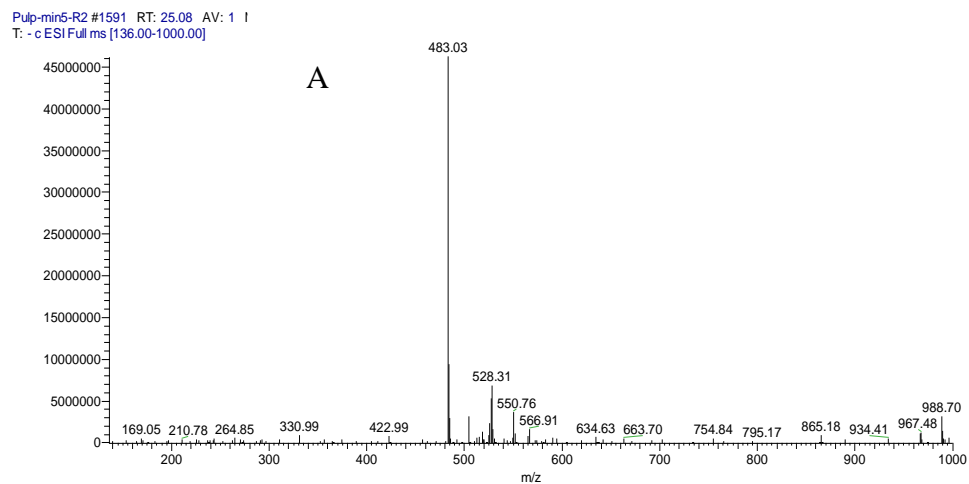
Anexo 5. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino D (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).



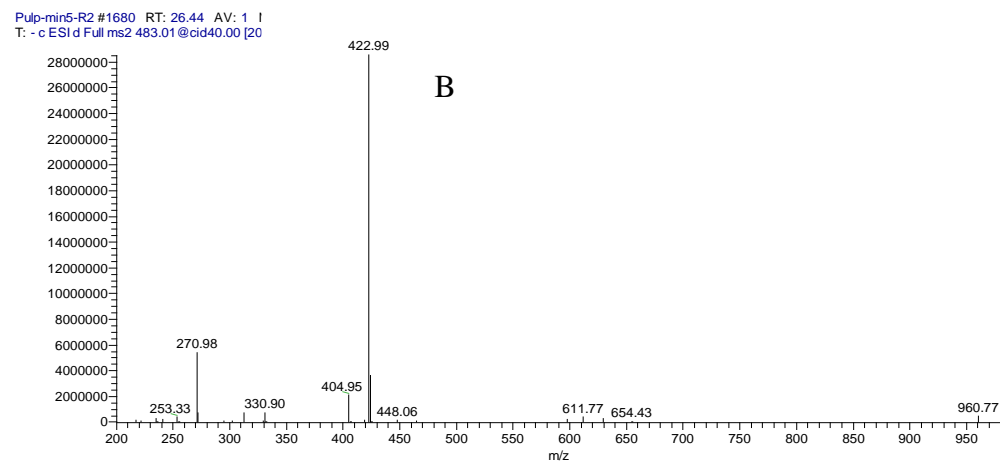
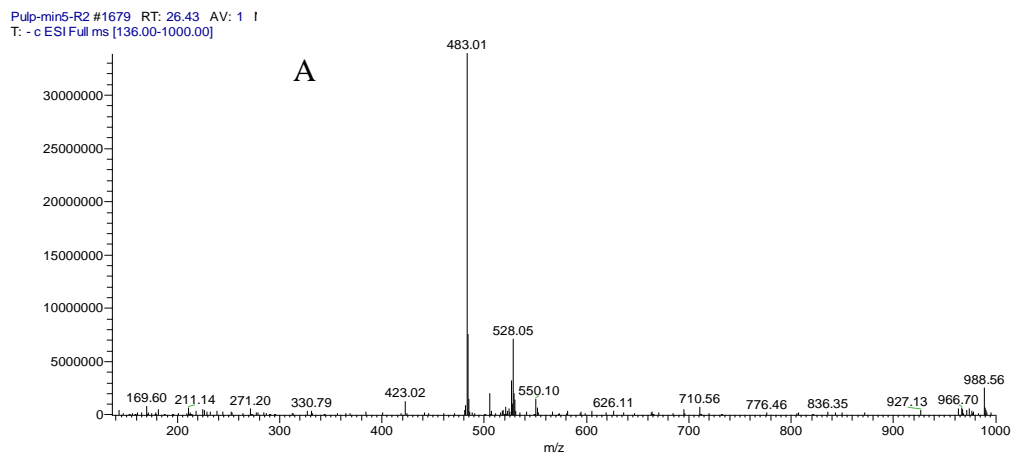
Anexo 6. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino E (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).



Anexo 7. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino F (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).



Anexo 8. Iones identificados en MS-LC del isómero éster-digalloil glucosa para el galotanino G (A: iones en el primer MS y B: iones en el segundo MS).



Anexo 9. Iones identificados en MS-LC de ácido gálico.

Pulp-min5-R2 #793 RT: 12.51 AV: 1 NL: :

T: - c ESI Full ms [136.00-1000.00]

