

**Evaluación del tiempo de hidrólisis
enzimática del zumaque (*Rhus coriaria*)
durante fase oral, gástrica e intestinal**

Mario Antonio Payán Alaniz

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación del tiempo de hidrólisis enzimática del zumaque (*Rhus coriaria*) durante fase oral, gástrica e intestinal

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

Mario Antonio Payán Alaniz

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Evaluación del tiempo de hidrólisis enzimática del zumaque (*Rhus coriaria*) durante fase oral, gástrica e intestinal

Mario Antonio Payán Alaniz

Resumen. El zumaque es un condimento muy utilizado en el medio oriente por poseer sabor acidulante debido a sus compuestos polifenólicos. Los taninos presentes en el zumaque, pueden ser hidrolizados haciendo uso de la enzima tanin-acil-hidrolasa (E.C. 3.1.1.20) conocida como tanasa. Los objetivos de este estudio fueron: (i) evaluar el efecto de hidrólisis enzimática empleando tanin-acil-hidrolasa durante la simulación gastrointestinal; (ii) identificar compuestos antes y después de hidrólisis enzimática en el extracto de zumaque y (iii) evaluar las concentraciones de ácido gálico obtenidos durante la fase oral, gástrica e intestinal. La hidrólisis realizada por tanasa degradó el 100% de los taninos de gran peso molecular convirtiéndolos en ácido gálico de menor peso molecular. La concentración de ácido gálico durante hidrólisis enzimática incrementó 282% mediante el método de rodanina y 256% de ácido gálico mediante espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS). Según el análisis de espectrometría, se identificó ácido gálico, mono, di, tri, tetra, penta, hexa, hepta, octa, nona-galoil glucosa y lambertianina A, B, C y D del extracto de la fruta del zumaque, por lo que, el incremento de ácido gálico liberado por la enzima tanasa, puede ser una alternativa en la prevención de enfermedades. Se recomienda continuar con estudios *in vitro* en la hidrólisis y la posible identificación de nuevos galotaninos en la fruta de zumaque.

Palabras clave: Ácido gálico, galotaninos, tanasa, taninos.

Abstract. Sumac is a condiment widely used in the Middle East for its acidifying flavor due to its polyphenolic compounds. The gallotannins present in sumac can be hydrolyzed using the enzyme tanin-acyl-hydrolase (E.C. 3.1.1.20) known as tannase. The objectives of this study were: (i) to evaluate the effect of enzymatic hydrolysis using tanin-acyl-hydrolase during the gastrointestinal simulation; (ii) identify compounds after enzymatic hydrolysis in the sumac extract and (iii) evaluate the concentrations of gallic acid obtained during oral, gastric and intestinal phases. The enzymatic hydrolysis performed by tannase degraded 100% of the tannins of high molecular weight converting them into gallic acid and gallotannins of lower molecular weight. The concentration of gallic acid during enzymatic hydrolysis increased 282% by the rhodanine assay and 256% gallic acid by mass spectrometry with liquid chromatography (LC-MS). According to the analysis of spectrometry, gallic acid, mono, di, tri, tetra, penta, hexa, hepta, octa, nona-galloyl glucose and lambertiannin A, B, C, and D of sumac fruit extract were identified, therefore, the increase in gallic acid released by the enzyme tannase can be an alternative in the prevention of diseases. It is recommended to continue with *in vitro* studies by hydrolysis to identify new gallotannins in sumac fruit.

Key words: Gallic acid, gallotannins, 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	5
4. CONCLUSIONES	14
5. RECOMENDACIONES	15
6. LITERATURA CITADA.....	16
7. ANEXOS.....	20

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Cuadro de ácido gálico (mg/L) antes y después de hidrólisis enzimática, mediante el ensayo de rodanina.....	6
2. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la fruta del zumaque (<i>Rhus coriaria</i>) por HPLC-MS.....	8
3. Cuantificación de galotaninos (mg/L) presentes en la fruta del zumaque (<i>Rhus coriaria</i>) mediante LC-MS.....	10
4. Cuantificación de lambertaninos (mg/L) presentes en la fruta del zumaque (<i>Rhus coriaria</i>) mediante LC-MS	11

Figuras	Página
1. Cromatograma representativo de compuestos polifenoles de la fruta del zumaque (<i>Rhus coriaria</i>), después de un minuto de incubación con la enzima tanasa	12
2. Cromatograma analizado antes de hidrólisis enzimática 0 (A). Cromatogramas analizados durante el minuto 1 (B), 60 (C) y 120 (D) después de hidrólisis enzimática. AG = ácido gálico; TN = taninos (desde penta hasta nona-galoil glucosa)	13

Anexos	Página
1. Curva estándar de ácido gálico mediante el ensayo de rodanina	20
2. Curva estándar de ácido gálico mediante LC-MS.....	20
3. Simulación de la digestión gastrointestinal	21
4. Cuantificación de ácido gálico (mg/L) de la fruta del zumaque (<i>Rhus coriaria</i>) a tres diferentes pH. Letras diferentes (A-B) indican diferencias entre tratamientos	21

1. INTRODUCCIÓN

La falta de actividad física y la mala alimentación son las principales causas de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y algunos tipos de cáncer; los cuales repercuten sustancialmente a la carga mundial de morbilidad, mortalidad y discapacidad (Organización Mundial de la Salud 2004). Debido a esto, ha incrementado la preocupación por parte de la población en consumir alimentos más saludables. También, gracias a ciertas estrategias realizadas por el Instituto de Seguridad Alimentaria y Nutrición, ha aumentado sustancialmente el consumo de frutas en los últimos años (Lassen *et al.* 2004).

El zumaque (*Rhus coriaria L*) es una fruta perteneciente a la familia de las Anacardiaceae, es ampliamente utilizado en todos los países del Medio Oriente, como un condimento muy popular en la acidificación de alimentos (Brookie *et al.* 2018). Varios componentes de esta fruta están relacionados con la actividad anticancerígena, antibacteriana (Abu *et al.* 2014) y antiviral (Giusti 2014). Estos compuestos bioactivos incluyen: taninos hidrolizables, antocianinas, ácido málico, flavonoides, derivados de terpenos y vitaminas (Kossah 2010; Abu Reidah *et al.* 2014). Se ha relacionado el consumo de zumaque con propiedades anticancerígenas, debido a su alto contenido de polifenoles (Majd *et al.* 2017).

Los compuestos polifenólicos son considerados metabolitos secundarios de las plantas, cumpliendo funciones principales dentro del metabolismo de ellas y protegiéndolas del ataque contra depredadores e interacciones alelopáticas (Ricco *et al.* 2015). Dentro de los polifenoles se encuentran los taninos, los cuales se subdividen en dos grandes grupos: taninos condensados e hidrolizables. Los primeros son los que tras hidrólisis liberan una proantocianidina; y los taninos hidrolizables que, luego de una hidrólisis ácida, básica o enzimática liberan ácido gálico o ácido elágico (Camas Molina 2016).

Dentro de los taninos hidrolizables se encuentran los galotaninos, los cuales están compuestos por una unidad de glucosa central a la que se le esterifican unidades de ácido gálico (Jourdes *et al.* 2013) y estos a su vez están unidos por enlaces depsídicos (Olivas *et al.* 2015). Por lo tanto, se ha venido utilizando la enzima tanasa para acelerar el proceso de hidrólisis de estos compuestos, obteniendo en un menor tiempo, unidades de ácido gálico libre.

La enzima tanasa (EC 3.1.1.20) se ha utilizado en la degradación de taninos, catalizando la hidrólisis de enlaces ésteres y depsídicos, sin romper las uniones entre carbonos, actuando solamente sobre taninos hidrolizados (Rodríguez *et al.* 2010). De esta manera, los galotaninos son hidrolizados, liberando ácido gálico y glucosa (Beniwal *et al.* 2013). Esta enzima tiene una amplia utilización en la industria de alimentos, especialmente en clarificación de cervezas y jugos de frutas, en bebidas de café, y para la prevención de

sabores astringentes en vinos, jugos y té instantáneo. También es utilizada en la industria del cuero y el aumento nutritivo en los piensos de ganado (Baik *et al.* 2015; Brahmhatt y Modi 2015).

Las investigaciones sugieren que entre más pequeño es un compuesto polifenólico, mayor es la probabilidad que este sea metabolizado (Talcott y Talcott 2009). Por lo que, al obtener mayor cantidad ácido gálico libre, existirá mayor absorción por parte del organismo, principalmente en la porción del intestino delgado. Por lo tanto, se requiere de métodos sofisticados y específicos para su cuantificación.

El ácido gálico es una molécula orgánica cuyo peso molecular es de 170.12 g/mol, el cual por su actividad biológica, principalmente por su capacidad antioxidante es utilizado en la industria farmacéutica (PubChem 2004). Esto debido a que sus grupos hidroxilos donan electrones para neutralizar los radicales libres, estabilizando las moléculas de oxígeno estables; deteniendo las reacciones en cadena provocadas por la oxidación (Yilmazer 2018).

Existe un interés por este compuesto, debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas a la salud humana. Sin embargo, se desconoce la cantidad de ácido gálico liberado de los taninos de zumaque tras la acción de la enzima tanasa de origen bacteriano *ex vitro* e *in vitro* durante la fase oral, gástrica e intestinal (duodeno y yeyuno). Los objetivos planteados en este estudio fueron:

- Evaluar el tiempo de hidrólisis enzimática de tanasa en el extracto de zumaque durante fase oral, gástrica e intestinal.
- Identificar compuestos antes y después de hidrólisis enzimática en el extracto de zumaque.
- Contrastar las concentraciones de ácido gálico obtenidos durante las tres fases digestivas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Frutas y Vegetables, del departamento de Nutrición y Ciencia de Alimentos. Situado en la Universidad de Texas A&M, College Station, Texas, Estados Unidos de Norteamérica.

Preparación de solución madre del extracto de zumaque.

El triturado de zumaque se encontraba en su bolsa original a temperatura ambiente, la cual se adquirió por la compañía Cerez Pazari (Estambul-Turquía). Se adicionó 200 gramos de zumaque y agua destilada (para cubrir el triturado) en un vaso de precipitado de 1000 ml. Se colocó sobre un plato caliente con agitador magnético durante 20 minutos a 35 °C. Después se filtró con malla y papel filtro utilizando una bomba al vacío. Se obtuvo una solución final de 600 ml, medidos con una probeta. Finalmente, la solución (333 g/L; 0.033 %) fue almacenada a -20 °C.

Preparación de la solución enzimática y solución de trabajo.

Se utilizó la enzima tanin acil hidrolasa, EC 3.1.1.20 de origen bacteriano de *Aspergillus oryzae*. Se preparó en buffer citrato 0.5 M a 5.5 pH, a una concentración de (tanasa 1%). Esta solución se realizó previa a su uso. La solución madre de extracto de zumaque se diluyó 1:10 con agua destilada para obtener la solución de trabajo (33.33 g/L).

Parte 1. Simulación *in vitro* del proceso digestivo.

El procedimiento se realizó con base a métodos reportados por (Pinazo 2015) con algunas modificaciones. Se preparó una solución-A, a 210 ml solución de trabajo se subió el pH a 6.8 con la adición de 520 µl de NaOH 6M. Se cuantificó el ácido gálico por el método de rodanina previo incubación enzimática. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y el pH de cada uno de los tratamientos se verificó. Los tratamientos para simular las fases oral, gástrica e intestinal se prepararon de la siguiente manera:

Fase oral (pH 6.7). Se preparó una solución-B, a 30 ml de la solución-A se le adicionó tres ml de saliva humana y se incubó a 37 °C durante uno y tres minutos con 300 µl de solución de tanasa 1%. Al final de la incubación, las muestras, se acidificaron con metanol y se colocaron en agua hirviendo durante 30 segundos, para detener la reacción enzimática.

Fase gástrica (pH 2.62). Se preparó una solución-C, a 24 ml solución-B se le agregó 14 ml jugo gástrico y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Se tomaron tres muestras del flujo continuo y se colocaron en agua hirviendo durante 30 segundos.

Fase intestino delgado (pH 6.52). Se preparó una solución-D, a 29 ml solución-C se le adicionó 12 ml de solución de bilis (12 mg/ml) y 12 ml de solución de pancreatina (2 mg/ml) disueltas en NaHCO₃ (0.1 M). Se incubó a 37 °C durante 60, 120, 180 y 240 minutos, respectivamente. Las muestras, se acidificaron con metanol y se colocaron en agua hirviendo durante 30 segundos.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se determinó el contenido de ácido gálico por el método rodanina y espectroscopia de masa con cromatografía líquida (LC-MS).

Ensayo de rodanina.

Se prepararon soluciones de (6, 12, 25, 50, 100 y 200 ppm) ácido gálico, diluidas en H₂O 0.1% ácido fórmico. Mediante los resultados obtenidos del método de rodanina se construyó la curva estándar de ácido gálico utilizando un espectrofotómetro de UV/Vis Thermo Scientific a 520 nm de longitud de onda. Este método se ejecutó de la siguiente manera: 0.6 ml rodanina (base metanol 0.667%) y 0.4 ml de muestra se agregaron en un tubo de ensayo (16 × 100 mm). Se esperó 10 minutos. Después se adicionó 0.4 ml de NaOH 0.5 M y se esperó por 15 minutos. Finalmente, se diluyó la solución en 8.6 ml de agua destilada y se leyó en el espectrofotómetro (520 nm) en una celda de plástico (10 × 10 × 45 mm). Ésta absorbancia se correlacionó con una curva estándar para obtener mg/L de ácido gálico.

Caracterización y cuantificación de compuestos con LC-MS.

Todas las muestras fueron filtradas con un filtro de 0.45 µm y colocadas en viales de 1.5 ml para ser analizadas. Se utilizó Thermo Finnigan LCQ Deca XP Max MS con trampa de iones equipado con una fuente ESI (Electrospray). Las separaciones se realizaron en fase reversa usando Finnigan Surveyor HPLC junto a un detector Surveyor PDS (detector fotométrico de llama). Los gradientes de separación fueron empleados usando Kinetex Phenomenex® C18 (150 × 4.6 mm, 2.6 µm). Las inyecciones fueron realizadas dentro de las columnas usando 60 µl de la muestra. Se utilizó metanol grado MS como fase móvil A y ácido fórmico al 0.1% a una velocidad de 0.4 mL/min como fase móvil B. El gradiente A fue de 100% durante 1 minuto. Cambió de 100 a 98% y se mantuvo durante los 15 minutos, de 98 a 40% de la fase A en 30 minutos, de 40 a 25% en 32 minutos. Se inyectó 10 µl de fase A para regresar al 100%. La interface de electrospray trabajó en modo negativo. Finalmente, todos los compuestos fueron cuantificados a 280 nm de longitud de onda.

Diseño experimental.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de dos variables, cuantificando ácido gálico y galotaninos a tres diferentes fases digestivas; con y sin tanasa. Las muestras se cuantificaron antes y después de hidrólisis enzimática con separación de medias TUKEY. Los datos fueron analizados mediante el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Digestión oral *in vitro*.

La enzima tanasa durante la fase oral degradó ciertos galotaninos del zumaque en moléculas más pequeñas como ácido gálico. El contenido de ácido gálico al minuto uno aumentó $50.46 \pm 2.50\%$, y al minuto tres aumentó $67.83 \pm 0.28\%$ de ácido gálico, respectivamente (cuadro 1). Sin embargo, no existió diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (con tanasa) y controles (sin tanasa); debido al tiempo de incubación.

Los tiempos de incubación durante esta fase son relativamente cortos (1 y 3 minutos), siendo incapaz la enzima tanasa de romper todos los enlaces esteres y depsídicos de los galotaninos (Rodríguez *et al.* 2010; Chávez *et al.* 2016). La actividad enzimática se ve afectada por el tiempo de incubación, ya que a medida transcurre el tiempo de reacción enzimática se observan nuevos productos (Bárcena *et al.* 2013). Se sabe que los galotaninos se auto-hidrolizan liberando ácido gálico en condiciones de pH neutro a alcalino (Mosele *et al.* 2016), explicando así el aumento del ácido gálico en los controles (sin tanasa) durante la fase oral.

Fase II. Gastrointestinal.

Las muestras analizadas eran dependientes ya que se realizó un flujo continuo para observar la degradación de taninos durante las tres fases. Durante 1 hora se simuló la fase gástrica, en la cual se le adicionó 7 ml de jugo gástrico a los tratamientos del zumaque y reduciendo el pH 2.62 ± 0.01 . La enzima tannin acetil hidrolasa siguió degradando los galotaninos de gran peso molecular del zumaque en moléculas más pequeñas. El contenido de ácido gálico al minuto 61 aumentó $174.07 \pm 6.33\%$ y al minuto 63 aumentó $169.46 \pm 9.74\%$ de ácido gálico, respectivamente (cuadro 1). Estos comparado contra el minuto cero (sin tanasa, ni tiempo de incubación); dando como resultado diferencias significativas ($P \leq 0.05$). De igual manera se observa 1.6 y 1.5 veces mayor la cantidad ácido gálico (mg/L) comparado contra sus controles. Esto debido a que el tiempo de incubación de las muestras fue prolongado durante 1 hora, dando oportunidad a la enzima EC 3.1.1.20 romper los enlaces esteres y depsídicos de los galotaninos hidrolizables (Brahmbhatt y Modi 2015). Temperatura y acidez hidrolizan los galotaninos del zumaque en ácido gálico y glucosa (Hagerman 2002). La interacción taninos-proteínas se debe a la unión de enlaces hidrógenos por medio de grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos y grupos carboxilos de los enlaces de las proteínas (Ramírez 2012). El efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa puede ser atribuida a sus aminoácidos y sitio activo a causa de la protonación y deprotonación; y a los cambios inducidos por la ionización de amino ácidos (Tanash *et al.* 2012).

Cuadro 1. Cuadro de ácido gálico (mg/L) antes y después de hidrólisis enzimática, mediante el ensayo de rodanina.

Trat. ² \ Min.	Blanco ¹	Oral	Gástrica	Intestinal			
	0 ³	1 & 3	60	120	180	240	300
C-1	1231 ± 42 ^{A(z)}	1755 ± 119 ^{A(y)}	2075 ± 140 ^{B(x)}	2098 ± 214 ^{B(x)}	1950 ± 121 ^{B(xy)}	2034 ± 73 ^{B(x)}	2021 ± 122 ^{B(x)}
C-3	1231 ± 42 ^{A(z)}	1834 ± 148 ^{A(yz)}	2158 ± 455 ^{B(y)}	2034 ± 856 ^{B(y)}	2058 ± 803 ^{B(y)}	2153 ± 868 ^{B(y)}	2456 ± 650 ^{B(y)}
T-1	1231 ± 42 ^{A(z)}	1853 ± 85 ^{A(y)}	3372 ± 60 ^{A(x)}	4139 ± 16 ^{A(w)}	4484 ± 66 ^{A(vw)}	4575 ± 279 ^{A(v)}	4413 ± 259 ^{A(vw)}
T-3	1231 ± 42 ^{A(z)}	2066 ± 68 ^{A(y)}	3320 ± 198 ^{A(x)}	4528 ± 77 ^{A(w)}	4631 ± 204 ^{A(w)}	4448 ± 130 ^{A(w)}	4708 ± 47 ^{A(w)}

¹Línea base (sin tanasa, ni tiempo de incubación). ²Tratamientos. ³Tiempo de incubación expresado en minutos.

C-1 Control: sin tanasa 1 min de incubación; C-3 Control: sin tanasa 3 min de incubación.

T-1 Tratamiento: con tanasa 1 min de incubación; T-3 Tratamiento: con tanasa 3 min de incubación.

Los resultados representan la media aritmética ± la Desviación estándar de tres repeticiones.

Medias con letra diferente (A-B) indican diferencias significativas entre la muestra control con su tratamiento ($P \leq 0.05$).

Medias con letra diferente (v-z) indican diferencias significativas entre de cada tratamiento durante el proceso digestivo ($P \leq 0.05$).

Fase III. Digestión intestinal.

Después de transcurrida la fase gástrica el pH se subió a 6.52 ± 0.06 por medio de la adición de pancreatina y bilis. Se evaluaron las muestras por cuatro horas (2-5), una muestra por hora. Evaluando de esta manera, solamente las dos primeras partes del intestino delgado (duodeno y yeyuno). La fase intestinal fue la que presentó mayor cantidad de ácido gálico libre, aumentando 271% y 282%; mientras que el aumento de ácido gálico en los controles fue de 70% y 101% (cuadro 1). Existiendo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamiento, control y blanco (no tanasa, ni tiempo de incubación).

El tiempo estimado para atravesar el intestino delgado es de 2 a 4 horas después de comer, y el intestino delgado es el sitio de absorción de muchos polifenólicos de bajo peso molecular, incluido ácido gálico (Bermúdez 2007). Los galotaninos se auto-hidrolizan liberando ácido gálico en condiciones de pH neutro a alcalino (Mosele *et al.* 2016) que podrían explicar el aumento en el ácido gálico en los controles (sin tanasa) durante la digestión intestinal.

Caracterización de compuestos polifenólicos por espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS).

Varios compuestos de los extractos de zumaque fueron específicamente identificados y caracterizados por espectroscopia de masas acopada a ESI (ionización en electrospray) en modo negativo. Por ejemplo, el ácido gálico libre fue identificado en base a su peso molecular, patrón de fragmentación y patrón espectral. En el cual un ión de m/z 204 fue el más abundante, seguidamente de un ión de m/z 169. La segunda etapa de análisis de masas (MS^2) mostró un patrón de fragmentación 169 m/z y en algunos casos 125 m/z (cuadro 2). Mono-galloil-glucosa mostró un ión predominante m/z 331 y un MS^2 de 169 m/z , debido a la pérdida de una molécula de glucosa (180g/mol) menos una molécula de agua (18g/mol) (Talcott y Talcott 2009).

Para compuestos de mayor peso molecular tales como la penta-galoil glucosa, un ion similar de m/z 939 fue encontrado al realizar fragmentación adicional para producir iones de m/z 787 que correspondieron a la tetra-galoil glucosa. Estos fragmentos, creados al inducir colisiones al compuesto padre, fueron de alguna manera análogos a los efectos de las enzimas hidrolíticas tanasa, resultando en un indicador de la fuerza o debilidad de los enlaces químicos presentes en los galotaninos (Talcott y Talcott 2009).

Se realizó un segundo análisis de masas, MS^2 , con el objetivo de conocer más específicamente sobre el ión precursor (Ayala 2004), siendo más certeros en la caracterización del mismo. La tanasa generó galotaninos de menor peso molecular (A, B, C, D y E) se identificaron a 280 nm de longitud de onda, sin embargo, estos no presentaban un MS^2 , a excepción del Galotanino-B (cuadro 2).

Cuadro 2. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la fruta del zumaque (*Rhus coriaria*) por HPLC-MS.

Pico N°	TR ¹ (min)	Compuesto	[M-H] ⁻ (m/z) ²	MS/MS ³
1	9.68	Galotanino-A	295	
2	11.43	Galotanino-B	353	173.5
3	12.15	Mono-galloil-glucosa	331	313, 271, 211, 169, 125
4	12.95	Galotanino-C	367	
5	13.98-14.32	Di-galloil-glucosa I	483	
6	15.03	Ácido gálico	169	125
7	16.23	Galotanino-D	367	
8	16.52	Di-galloil-glucosa II	483	465, 331, 313, 271, 169
9	17.23-18.00-18.53	Tri-galloil-glucosa	635	483, 465, 271
10	19.2	Tetra-galloil-glucosa	787	635, 617, 483, 465, 313
	19.85	Penta-galloil-glucosa	939	787, 769, 635, 617
	20.15	Hexa-galloil-glucosa	1091	617, 545
11	20.44	Hepta-galloil-glucosa	1243	621, 545
	20.74	Octa-galloil-glucosa	1395	697, 620, 545
	21.04	Nona-galloil-glucosa	1547	773, 697, 621, 545

¹Tiempo de retención expresado en minutos. ²Relación masa a carga. ³Segunda etapa de análisis de masas.

El Galotanino-A no se encontró antes de hidrólisis enzimática y sólo fue posible su cuantificación en los tratamientos con tanasa. Presentó un m/z 295, el cual podría ser el ácido p-cumariltartárico. Galotanino-B presentó un ión predominante m/z 353 podría ser un ácido hidroxícitrico (HCA), específicamente el ácido 4-cafeoilquinico. Galotanino-C presentó un ión predominante m/z 367, seguido de un m/z 331 siendo el ácido feruloilquinico. Galotanino-D se observa un ión de m/z predominante de 518, seguido de un ión de 483 m/z, el cual podría ser mono-galloil glucosa, pero con una posición m-depsídicos lo cual convierte a este compuesto un poco menos polar, dando como resultado una elución en un mayor tiempo. Galotanino-E presentó un ión predominante m/z 367, sin embargo, a diferencia del Galotanino-C este último fue eludido en un tiempo de retención menor de aproximadamente cuatro minutos. Galotanino-B (13.98;14.32) y Tri-galloil-glucosa (17.23;18.00;18.53) presentaron varios tiempos de retención, sin embargo, mostraron el mismo m/z y MS² (cuadro 2).

Se identificó el compuesto Mono-galloil glucosa con un tiempo de retención menor al ácido gálico. Esto se debe a que la adición de glucosa le confiere mayor polaridad y por tanto más rápida elución dentro la columna (Negrete 2015). Mono-galloil-glucosa mostró un ion de 331 m/z y una fragmentación con una pérdida de 162 Da correspondiente al radical de glucosa.

Tentativamente se identificó un m/z 545 en hojas de zumaque como dihidroxibenzoico digalato de acetato (Abu *et al.* 2014), atribuyendo a la fragmentación del hexa, hepta, octa y nona-galoil glucosa. El pico número 11 se consideró como taninos, (desde penta hasta nona-galoil glucosa), ya que todos estos están debajo de la misma curva. Esto se debe a que las muestras de zumaque analizadas estaban muy concentradas.

La acción catalítica de la enzima tanasa fue exitosa, degradando el 100% de los galotaninos, tanto de gran peso molecular (desde penta hasta nona-galoil glucosa) como los de menor peso molecular. En los tratamientos, la hidrólisis de los galotaninos incrementó la concentración de ácido gálico en un 248%, mientras el uso de control aumentó 159% (cuadro 3). Esta diferencia se debe a que la tanasa fue capaz de unirse al sitio activo del sustrato, degradando así las moléculas de gran tamaño en unas de menor tamaño. Basándose nuevamente que entre más pequeño es un compuesto polifenólico, mayor es la probabilidad de que este sea metabolizado (Talcott y Talcott 2009). Se plantea que entre más rápido sea liberado el ácido gálico durante la digestión, tendrá mayor probabilidad de absorción por parte del organismo, previniendo de esta forma la oxidación celular y evitando el padecimiento de enfermedades.

Mono-galoil-glucosa solo pudo cuantificarse después del tratamiento enzimático, teniendo su mayor concentración (280 mg/L) en la fase gástrica. Este incremento se debe a que la enzima tiene como mecanismo de liberar los enlaces ésteres, o sea enlaces entre ácidos gálicos y glucosa presentes en los galotaninos (Kumar *et al.* 2007). Tri-galoil-glucosa presentó varios tiempos de retención (17.23; 18.00; 18.53 min), sin embargo, presentó el mismo m/z y MS2, por lo que se cuantificó como un mismo grupo (cuadro 3).

En todos los puntos de la fase intestinal de la cuantificación de ácido gálico se mostró diferencias significativas entre el tratamiento y control. En el caso de la reducción de taninos (desde penta hasta nona-galoil glucosa) se muestran diferencias significativas desde la fase gástrica.

La concentración de lambertanino (A, B, C, y D) fue mínima. Se consideró que el uso de la enzima tanasa influyó en la aparición del lambertanino-A y que el tiempo de incubación intervino en la aparición de lambertanino-B durante la última parte del intestino delgado (cuadro 4).

Cuadro 3. Cuantificación de galotaninos (mg/L) presentes en la fruta del zumaque (*Rhus coriaria*) mediante LC-MS.

Compuesto	Blanco ¹	Oral	Gástrica	Intestinal			
	0 ²	1	60	120	180	240	300
GA ⁵	619 ± 0.3 ^{A(z)}	668 ± 1.6 ^{A(z)}	1032 ± 1.7 ^{A(y)}	1584 ± 0.7 ^{B(x)}	1578 ± 3.0 ^{B(x)}	1591 ± 0.5 ^{B(x)}	1605 ± 0.4 ^{B(x)}
1GG	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{B(z)}	Nd ⁷	Nd	Nd	Nd
2GG-I	249 ± 0.3 ^{A(yz)}	338 ± 19 ^{A(yz)}	382 ± 73 ^{A(y)}	246 ± 3.2 ^{A(yz)}	212 ± 65 ^{A(z)}	228 ± 1.8 ^{A(yz)}	267 ± 5.4 ^{A(yz)}
2GG-II	5.8 ± 1.2 ^{A(z)}	3.7 ± 5.4 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	Nd	Nd	Nd	Nd
3GG	249 ± 7.2 ^{A(yz)}	346 ± 31 ^{A(yz)}	396 ± 110 ^{A(y)}	214 ± 8 ^{A(yz)}	224 ± 56 ^{A(yz)}	188 ± 10 ^{A(z)}	246 ± 6.3 ^{A(yz)}
4GG	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	11 ± 5.8 ^{A(y)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}
Taninos ⁶	1407 ± 32 ^{A(x)}	1706 ± 90 ^{A(x)}	2637 ± 85 ^{A(w)}	703 ± 87 ^{A(y)}	368 ± 25 ^{A(yz)}	354 ± 156 ^{A(yz)}	293 ± 39 ^{A(z)}
GA	619 ± 0.3 ^{A(z)}	729 ± 0.7 ^{A(y)}	1238 ± 0.9 ^{A(x)}	2150 ± 0.2 ^{A(w)}	2156 ± 0.7 ^{A(w)}	2204 ± 0.4 ^{A(w)}	2203 ± 0.1 ^{A(w)}
1GG	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	103 ± 39 ^{A(xy)}	280 ± 10 ^{A(w)}	189 ± 77 ^{A(wx)}	82 ± 10 ^{A(xy)}	6.5 ± 9 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}
2GG-I	249 ± 0.3 ^{A(z)}	216 ± 42 ^{A(z)}	158 ± 15 ^{A(z)}	Nd	Nd	Nd	Nd
2GG-II	5.8 ± 1.2 ^{A(z)}	57 ± 8.4 ^{A(yz)}	128 ± 18 ^{A(y)}	Nd	Nd	Nd	Nd
3GG	249 ± 7.2 ^{A(y)}	268 ± 17 ^{A(y)}	262 ± 9.7 ^{A(y)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{B(z)}	0.0 ± 0.0 ^{B(z)}
4GG	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}
Taninos	1407 ± 32 ^{A(w)}	1360 ± 152 ^{A(w)}	316 ± 141 ^{B(x)}	63 ± 101 ^{B(xy)}	14 ± 40 ^{B(xy)}	0.0 ± 0.0 ^{B(z)}	0.0 ± 0.0 ^{B(z)}

¹Línea base (sin tanasa, ni tiempo de incubación). ²Tiempo de incubación expresado en minutos. ³Control: sin tanasa. ⁴Tratamiento: con tanasa. ⁵Galotaninos identificados. ⁶Galotaninos desde penta hasta nona-galoil glucosa. ⁷No determinado.

Los resultados representan la media aritmética ± desviación estándar.

Medias con letra diferente (A-B) indican diferencias significativas entre la muestra control con su tratamiento ($P \leq 0.05$).

Medias con letra diferente (w-z) indican diferencias significativas entre de cada tratamiento durante el proceso digestivo ($P \leq 0.05$).

Cuadro 4. Cuantificación de lambertaninos (mg/L) presentes en la fruta del zumaque (*Rhus coriaria*) mediante LC-MS.

Compuesto	Blanco ¹	Oral	Gástrica	Intestinal				
	0 ²	1	60	120	180	240	300	
Ct. ³	LT-A ⁵	Nd ⁶	Nd	Nd	0.0 ± 0.0 ^{B(y)}	0.0 ± 0.0 ^{B(y)}	0.0 ± 0.0 ^{B(y)}	0.0 ± 0.0 ^{A(y)}
	LT-B	Nd	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	12 ± 18 ^{A(yz)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	40 ± 14 ^{A(y)}
	LT-C	41 ± 2.9 ^{A(y)}	62 ± 15 ^{A(y)}	48 ± 39 ^{A(y)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}
	LT-D	Nd	Nd	Nd	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}
Trat. ⁴	LT-A	Nd	13 ± 4.8 ^{A(z)}	54 ± 3.1 ^{A(z)}	63 ± 2.1 ^{A(z)}	36 ± 4 ^{A(z)}	21 ± 0.2 ^{A(z)}	42 ± 29 ^{A(z)}
	LT-B	Nd	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	Nd	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	34 ± 7.8 ^{A(y)}
	LT-C	41 ± 2.9 ^{A(y)}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	LT-D	Nd	Nd	Nd	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}	0.0 ± 0.0 ^{A(z)}

□ ¹Línea base (sin tanasa, ni tiempo de incubación). ²Tiempo de incubación expresado en minutos. ³Control: sin tanasa. ⁴Tratamiento: con tanasa. ⁵Galotaninos identificados. ⁶No determinado.

Los resultados representan la media aritmética ± la Desviación estándar.

Medias con letra diferente (A-B) indican diferencias significativas entre la muestra control con su tratamiento ($P \leq 0.05$).

Medias con letra diferente (y-z) indican diferencias significativas entre de cada tratamiento durante el proceso digestivo ($P \leq 0.05$).

Naturalmente el zumaque presenta ácido gálico libre, mono, di, tri, tetra y taninos (penta-nona-galoil-glucosa) los cuales por ser estructuralmente diferentes eluden en diferentes tiempos (figura 1).

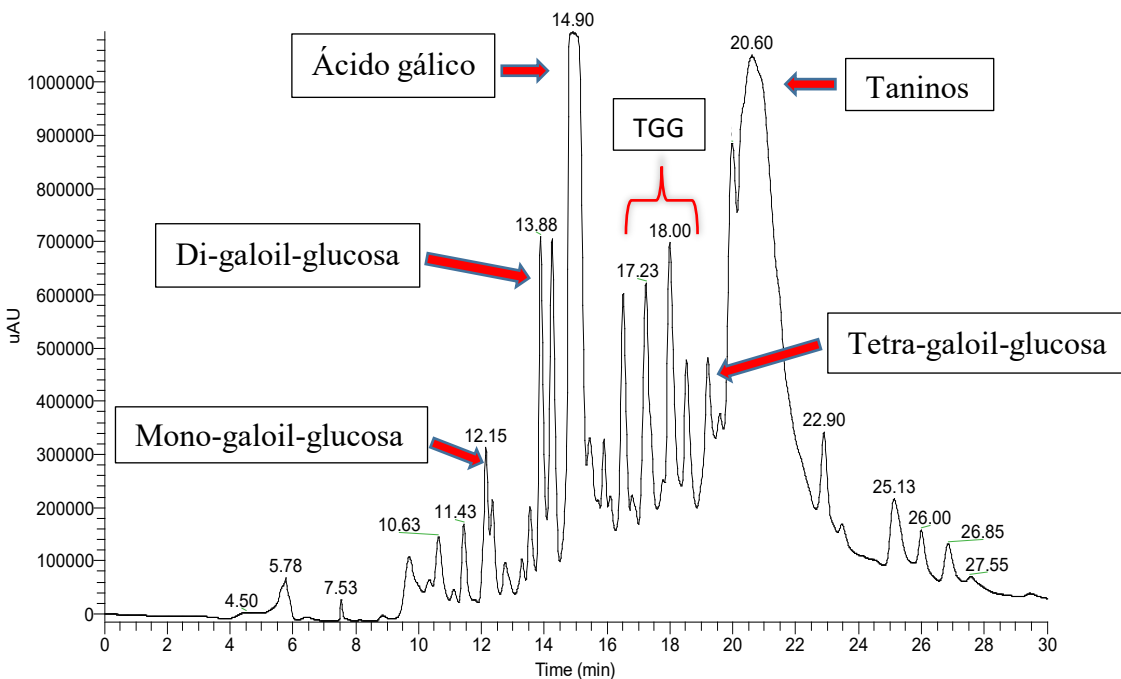


Figura 1. Cromatograma representativo de compuestos polifenoles de la fruta del zumaque (*Rhus coriaria*), después de un minuto de incubación con la enzima tanasa.

De acuerdo a estudios previos, los principales compuestos de taninos presentes en la familia *Rhus* son los galotaninos. Estos compuestos fueron separados por un valor de masa constante de 152 Da correspondiente a la unidad de galoil (Romeo *et al.* 2015). Se observó un cambio en el tiempo de retención del ácido gálico. Sin uso de la enzima tanasa ni tiempo de incubación, presentó un tiempo de 15.03 min en la elución del ácido gálico (figura 2-A), mientras que en los cromatogramas después de incubación enzimática, presentó un tiempo de elución de 14.89 ± 0.01 min (figura 2-B-D), el cual pudo ser debido que a medida cambia la distribución de concentraciones y presencia de compuestos de diferentes polaridades en la columna hay una variabilidad en los tiempos de retención (Beyaza *et al.* 2014).

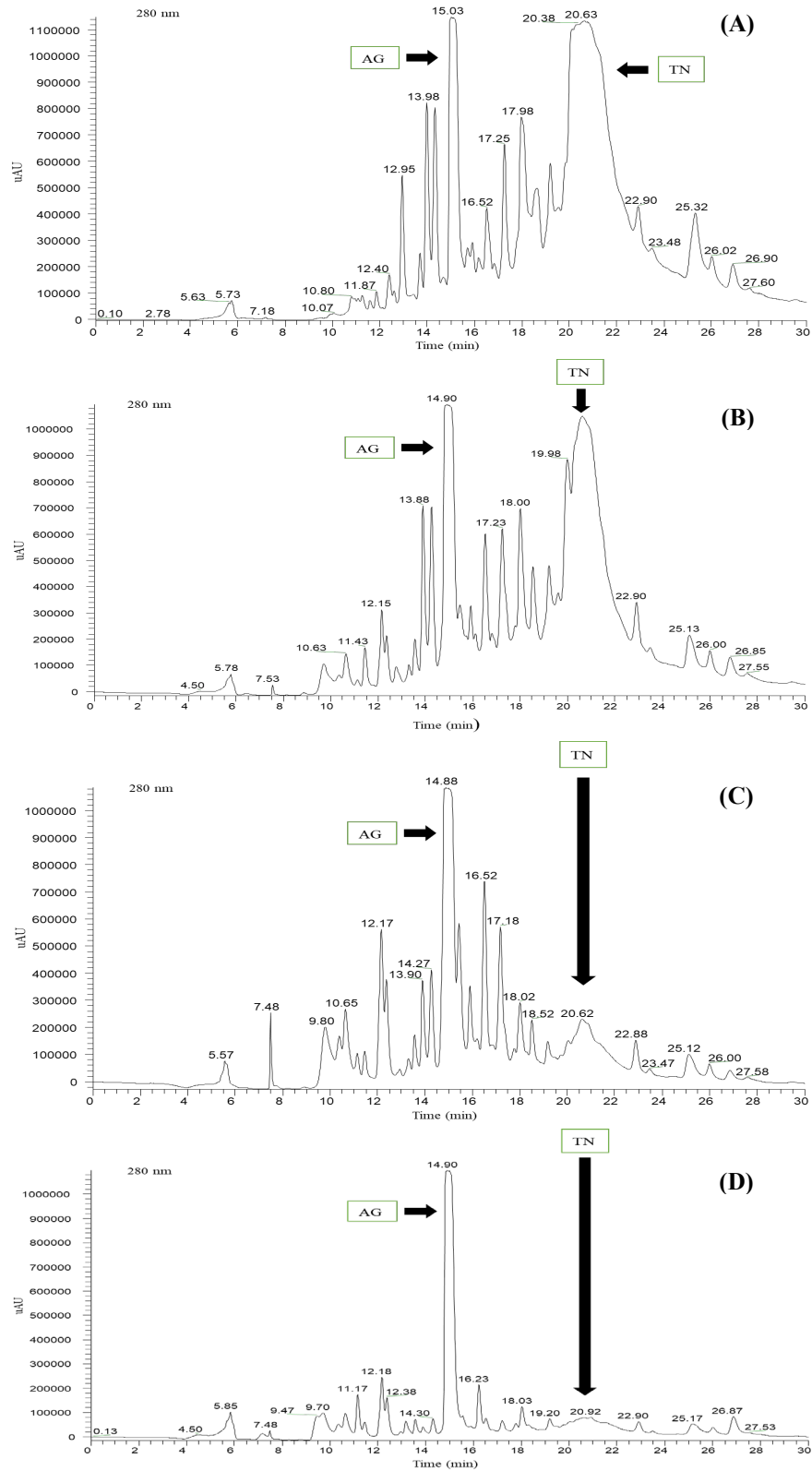


Figura 2. Cromatograma analizado antes de hidrólisis enzimática 0 (A). Cromatogramas analizados durante el minuto 1 (B), 60 (C) y 120 (D) después de hidrólisis enzimática. GA = ácido gálico; TN = taninos (desde penta hasta nona-galoil glucosa).

4. CONCLUSIONES

- La adición de la enzima tanasa aumenta la velocidad hidrolítica de los taninos del extracto de zumaque durante el transcurso de la digestión.
- Se identificaron 15 compuestos (ácido gálico, mono, di, tri, tetra, penta, hexa, hepta, octa, nona-galoil glucosa y lambertaninos A, B, C y D) antes y después de hidrólisis enzimática en fruta del zumaque.
- La acción catalítica de la enzima tanasa fue efectiva, hidrolizando el 100% de los taninos y galotaninos durante la fase intestinal, con la liberación más alta de 2204 ± 0.4 mg / L de ácido gálico.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de hidrólisis enzimática después de cinco horas de transcurrida la digestión.
- Evaluar más detalladamente el método de rodanina y LC-MS en la fruta del zumaque, obteniendo un factor de conversión y posterior uso al método de rodanina para cuantificación de ácido gálico.
- Seguir identificando los compuestos fenólicos de la hidrólisis enzimática de la fruta del zumaque.
- Realizar experimentos *in vivo* observando absorción durante todo el sistema digestivo.
- Realizar prototipos nutracéuticos y evaluar su efecto *in vivo*.

6. LITERATURA CITADA

Abu Reidah IM, Ali Shtayeh MS, Jamous RM, Arráez RD, Segura CA. 2015. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. Food Chemistry. [Consultado 2018 abr. 13]. 166:179–191. eng. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.011.

Ayala C. 2004. Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. [internet]. Cuernavaca: UNAM; [Consultado 2018 jun 16]. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_proteinas.pdf.

Baik JH, Shin K-S, Park Y, Yu K-W, Suh HJ, Choi H-S. 2015. Biotransformation of catechin and extraction of active polysaccharide from green tea leaves via simultaneous treatment with tannase and pectinase. J Sci Food Agric. [Consultado 2018 jun 16]. 95(11):2337–2344. eng. doi:10.1002/jsfa.6955.

Bárcena J, García C, Padilla C, Martínez E, Díez J. 2013. Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina. Tecnociencia Chihuahua. [Consultado 2018 jul 10]. Vol. VI, No. 2: 112-120. <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/30%20FOSFATASA%20ALCALINA.pdf>.

Beniwal V, Kumar A, Sharma J, Chhokar V. 2013. Recent advances in industrial application of tannases: A review. Recent Pat Biotechnol. [Consultado 2018 abr. 10]. 7(3):228–233. eng. doi: 10.2174/18722083113076660013.

Bermudez S. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. Food Chemistry. [Consultado 2018 may 10]. 102(3):865–874. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.025.

Beyaza A, Fana W, Carr PW, Schellinger AP. 2014. Instrument parameters controlling retention precision in gradient elution reversed-phase liquid. J Chromatogram A. [Consultado 2018 may 10]. 1371:90–105. eng. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.085.

Brahmbhatt D, Modi HA. 2015. Comparative studies on methods of tannase. International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET). [Consultado 2018 abr. 22]. 3:715-720. eng. <https://www.ijraset.com/fileserve.php?FID=1949>.

Brookie KL, Best GI, Conner TS. 2018. Intake of raw fruits and vegetables is associated with better mental health than intake of processed fruits and vegetables. *Front Psychol.* [Consultado 2018 may. 05]. eng. doi:10.3389/fpsyg.2018.00487.

Camas Molina A. 2016. Utilización del método rodanina para determinar hidrólisis enzimática de compuestos del mango (*Mangifera indica*) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 1 p.

Chávez M, Buenrostro-Figueroa J, Rodríguez D, Zárata P, Rodríguez R, Rodríguez-Jasso M, Ruiz H, Aguilar C. 2016. Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products. 1ra ed. Iztapalapa (México): [Consultado 2018 mar 25]. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00020-8>.

Giusti G. 2014. *Rhus coriaria L. (Sommacco siciliano)*: studio della composizione dell'olio essenziale e dei volatili di piante spontanee raccolte in Sicilia. Stato dell'arte sulla composizione fitoquímica, attività biologica ed usi tradizionali della pianta [internet]. Italia: Università Di Pisa; [Consultado 2018 mar 19]. <https://etd.adm.unipi.it/t/etd-10272014-104642/>.

Hagerman AE. 2002. Tannin chemistry. In: *The tannin handbook*. Oxford (Estados Unidos): [Consultado 2018 mar 27]. <https://www.users.miamioh.edu/hagermae/>

Jourdes M, Pouységu L, Deffieux D, Teissedre P-L, Quideau S. 2013. Hydrolyzable tannins: gallotannins and ellagitannins. In: Ramawat KG, Merillon JM, editors. *Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Heidelberg, New York: Springer. p. 1975–2010.

Kumar R, Sharma J, Singh R. 2007. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. *Microbiological Research*. 162(4):384–390. eng. doi:10.1016/j.micres.2006.06.012.

Lassen A, Thorsen AV, Trolle E, Elsig M, Ovesen L. 2004. Successful strategies to increase the consumption of fruits and vegetables: results from the danish '6 a day' work-site canteen model study. *Public Health Nutrition*. 7(2):263–270. eng. doi:10.1079/PHN2003532.

Majd NS, Coe S, Thondre S, Lightowler H. 2017. Determination of the antioxidant activity and polyphenol content of different types of *Rhus coriaria* (sumac) from different regions. *Proceedings of the Nutrition Society*. [Consultado 2018 jun 30]. 7(2):233-244. eng. doi:10.1017/S0029665117002993.

Mosele J, Macia A, Romero M, Motilva MJ. 2016. Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*. 201:120–130. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.076.

Negrete Obando M. 2015. Hidrólisis enzimática e identificación de galotaninos en el extracto de mango (*Mangifera indica*) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 14 p.

Olivas F, Wall A, González G, López J, Álvarez E, De la Rosa L, Ramoz A. 2015. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal [Consultado 2018 may 19]: 31(1):55–66. eng. <http://www.redalyc.org/pdf/3092/309232878005.pdf>.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2004. Estrategia Mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. OMS [Consultado 2018 mar 28]. eng. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43037/1/924359222X_spa.pdf.

Pinazo A. 2015. Evaluación *in vitro* de los cambios experimentados por las propiedades antioxidantes del fruto, hojas y fibra de caqui durante la digestión gastrointestinal [Tesis]. Universidad Politécnica de Valencia-España. 7-8 p.

Prinz JF, Lucas PW. 2000. Saliva tannin interactions. Journal of Oral Rehabilitation. 27(11):991–994. eng. doi.org/10.1111/j.1365-2842.2000.00578.x.

PubChem. 2004. Gallic Acid [internet]. USA: U.S. National Library of Medicine; [Consultado 2018 jun 13]. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid.

Ramírez CJ. 2012. Factores físicos y químicos que intervienen en la interacción tanino-proteína y su relación con la sensación de astringencia [Tesis]. Universidad de Chile-Chile. 15 p.

Ricco R, Agudelo I, Wagner M. 2015. Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad [Tesis]: Universidad de Buenos Aires-Argentina. 161 p.

Rodríguez LV, Valdivia Urdiales B, Contreras Esquivel JC, Rodríguez Herrera R, Aguilar CN. 2010. Química y biotecnología de la tanasa. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila: [Consultado 2018 abr. 24]. 2(4):1-8. eng. <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM4/Qu%C3%ADmica%20y%20Biotecnologia%20de%20la%20Tanasa%20Rdz.-Duran.pdf>.

Romeo FV, Ballistreri G, Fabroni S, Pangallo S, Nicosia MGLD, Schena L, Rapisarda P. 2015. Chemical characterization of different sumac and pomegranate extracts effective against *Botrytis cinerea* rots. Molecules. 20(7):11941–11958. eng. doi:10.3390/molecules200711941.

Soares S, García I, Ferrer-Galego R, Brás N, Brandao E, Silva M, Teixeira N, Fonseca F, Sousa S, Ferreira-da-Silva F, et al. 2018. Study of human salivary proline-rich proteins interaction with food tannins. Food Chemistry. (243):175–185. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.063.

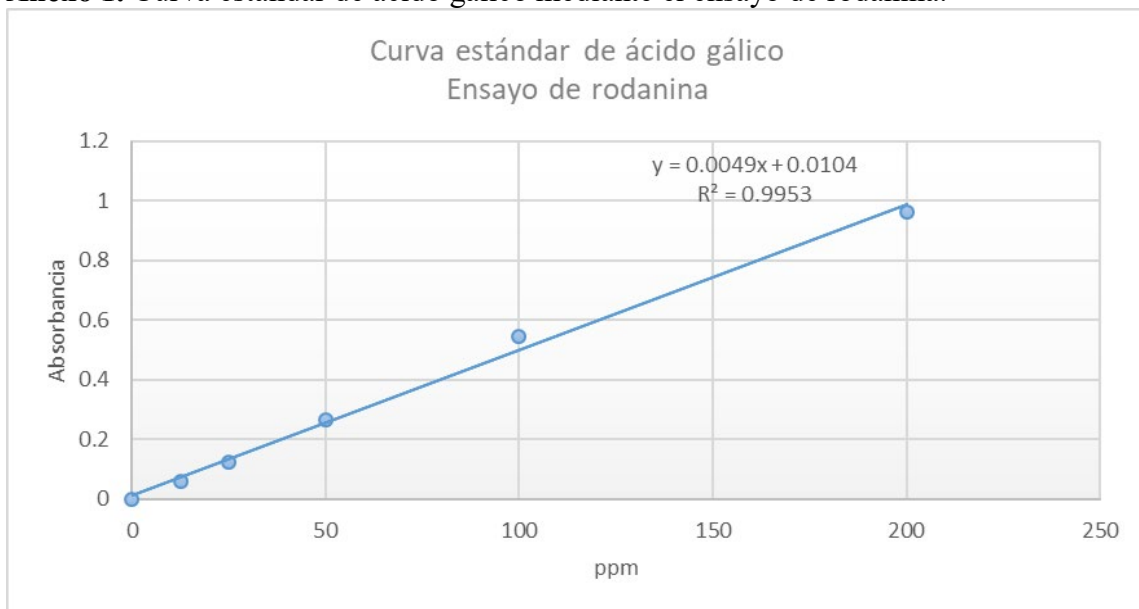
Talcott, Talcott. 2009. Mass spectroscopic and HPLC characterization of mango (*Mangifera indica L.*): phytochemical attributes contribute to the health-promoting benefits of mangos. Universidad de Texas A&M. eng. http://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Nutrition_and_Cancer_Cells_Final_Report_Eng.pdf.

Tanash R, Abdel-Dayem S, NOUR A. 2012. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. Food Biotechnolgy. [Consultado 2018 jun 24]. (10):9-17. eng. https://www.researchgate.net/publication/221675919_OPTIMIZATION_THE_HYDROLYSIS_PROCESS_OF_TANNIC_ACID_FOR_GALLIC_ACID_PRODUCTION_BY_TANNASE_OF ASPERGILLUS AWAMORI_USING_RESPONSE_SURFACE_METHODOLOGY.

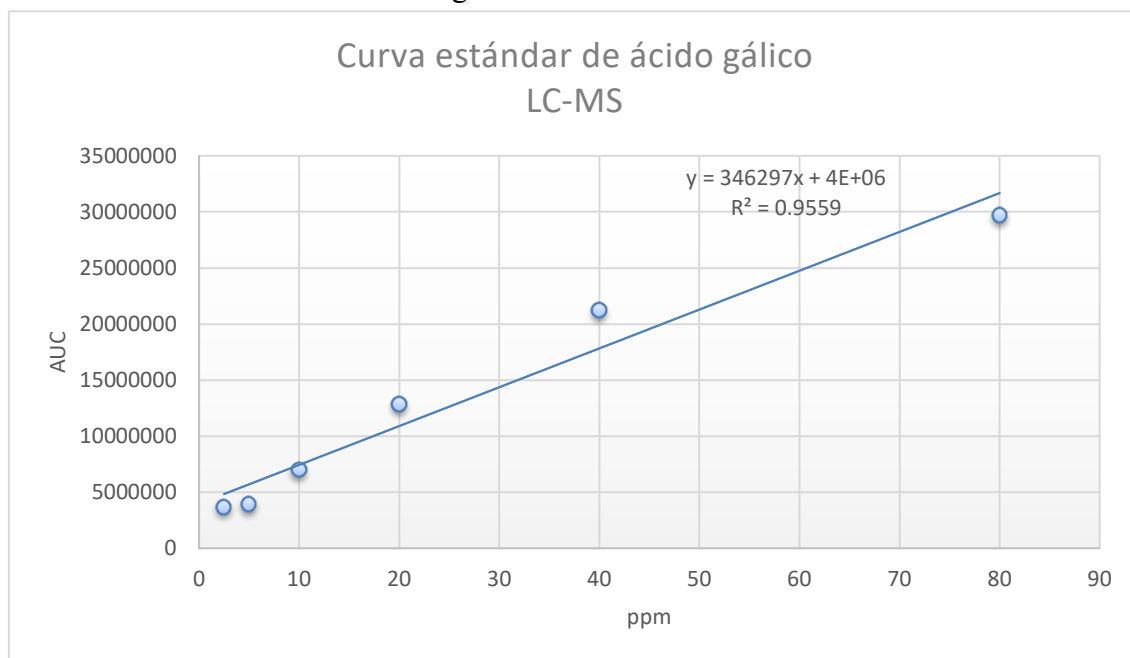
Yilmazer A. 2018. Cancer cell lines involving cancer stem cell populations respond to oxidative stress. Biotechnology Reports. (17):24–30. eng. doi:10.1016/j.btre.2017.11.004.

7. ANEXOS

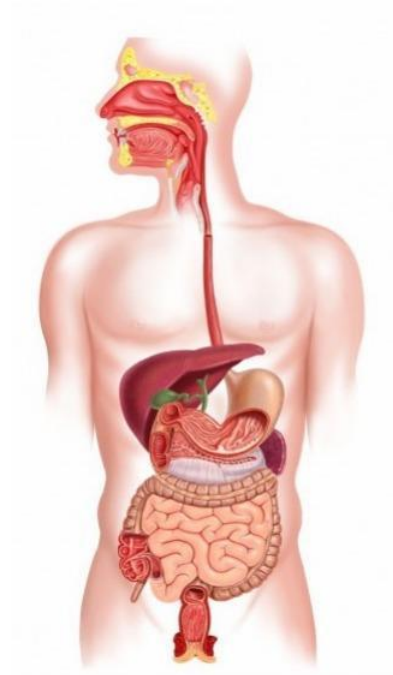
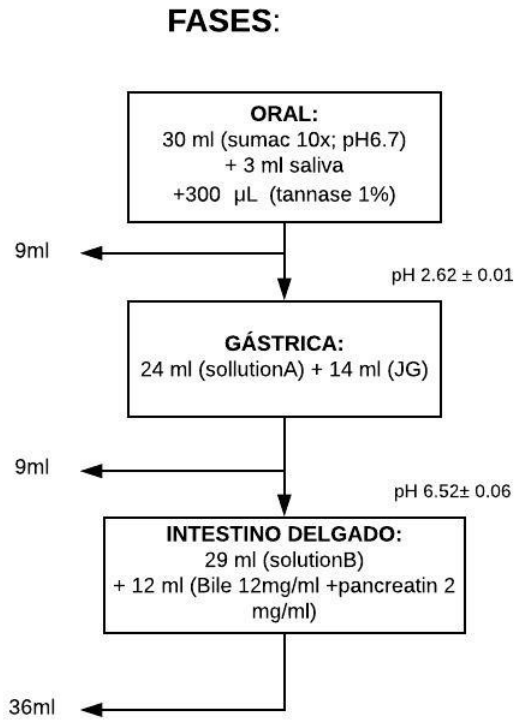
Anexo 1. Curva estándar de ácido gálico mediante el ensayo de rodanina.



Anexo 2. Curva estándar de ácido gálico mediante LC-MS



Anexo 3. Simulación de la digestión gastrointestinal.



Anexo 4. Cuantificación de ácido gálico (mg/L) de la fruta del zumaque (*Rhus coriaria*) a tres diferentes pH. Letras diferentes (A-B) indican diferencias entre tratamientos.

