

**Utilización del método rodanina para
determinar hidrólisis enzimática de
compuestos del mango (*Mangifera indica*)**

Andrea Michelle Camas Molina

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Utilización del método rodanina para determinar hidrólisis enzimática de compuestos del mango (*Mangifera indica*)

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

Presentado por

Andrea Michelle Camas Molina

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Utilización del método rodanina para determinar hidrólisis enzimática de compuestos del mango (*Mangifera indica*)

Andrea Michelle Camas Molina

Resumen: Rodanina es un reactivo que forma un complejo de color rosado con el ácido gálico en ambientes alcalinos. Los galotaninos presentes en el mango, pueden ser hidrolizados haciendo uso de la enzima tanin-acil-hidrolasa (E.C. 3.1.1.20) conocida como tanasa. Los subproductos de esta hidrólisis son ácido gálico, galotaninos de menor tamaño y eventualmente glucosa. Los objetivos de este estudio fueron: determinar la efectividad y especificidad del ensayo rodanina (Fase I); evaluar la hidrólisis de mono-galoil-glucosa (MGG) y penta-galoil-glucosa (PGG) haciendo uso de tanasa mediante ensayo rodanina y cromatografía líquida (Fase II) y proponer otros usos del ensayo rodanina (Fase III). La rodanina formó un complejo de color rosado con ácido gálico y pirogalol. El límite de detección del ensayo fue de 1 a 100 mg/L de ácido gálico. No se formó el complejo de color con catecol, resorcinol, MGG ni PGG demostrando su especificidad al ácido gálico (Fase I). La cuantificación de ácido gálico difirió usando los dos métodos evaluados (Fase II). La velocidad de la hidrólisis de MGG fue menor a la de PGG. Mediante HPLC-ESI-MS se identificó ácido gálico y compuestos intermedios (di, tri y tetra-galoil-glucosa) resultantes de la hidrólisis de PGG. Se evaluó el uso del ensayo rodanina para la identificación de tanasa en superficies de mango en campo y la aplicación del ensayo en muestras de orina para la identificación de metabolitos de ácido gálico (Fase III). Se recomienda continuar la investigación y evaluar otras aplicaciones para este ensayo.

Palabras clave: Ácido gálico, detección rápida, galotaninos, tanasa

Abstract: Rhodanine is a reagent that forms a pink color complex with gallic acid at alkaline environments. Gallotannins present in mango, can be enzymatically hydrolyzed using tannin-acyl-hydrolase (E.C. 3.1.1.20) known as tannase. The subproducts of the hydrolysis are gallic acid, smaller gallotannins and eventually glucose. The objectives of this study were: to determine the effectiveness and specificity of the rhodanine assay (Phase I); evaluate the enzymatic hydrolysis of mono-galloyl-glucoside (MGG) and penta-galloyl-glucoside (PGG) using tannase with rhodanine assay and liquid chromatography (Phase II) and propose other usages of rhodanine assay (Phase III). Rhodanine formed a pink color complex with gallic acid and pyrogallol. The detection limit of rhodanine assay was from 1 to 100 mg/L of gallic acid. A color complex was not formed with catechol, resorcinol, MGG or PGG showing its specificity to gallic acid (Phase I). Rhodanine results differ from HPLC for gallic acid quantification. The rate of hydrolysis at which MGG was broken down was slower than PGG. When using HPLC-ESI-MS to analyze the PGG hydrolysis, gallic acid and intermediate compounds (di, tri and tetra galloyl glucosides) were found. The use of rhodanine assay to identify tannase on wild mangos surface and an application on urine samples to identify gallic acid metabolites was proposed (Phase III). It is recommended to continue with the study and evaluate other applications to the assay.

Key words: Gallic acid, gallotannins, rapid detection, tannase

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iii
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA.....	20
7. ANEXOS	24

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Ensayo rodanina con diferentes compuestos fenólicos y metabolitos.....	7
2. Concentración de ácido gálico luego de hidrólisis de penta-galoil-glucosa haciendo uso de tanasa a 10^{-3} U/ml medido mediante ensayo rodanina y HPLC-MS.....	11
3. Concentración de ácido gálico luego de hidrólisis de mono-galoil-glucosa haciendo uso de tanasa a 10^{-3} U/ml medido mediante ensayo rodanina y HPLC-MS.....	15
4. Efecto de alcohol en la actividad de tanasa.	17
Figuras	Página
1. Estabilidad de complejo de color rodanina-ácido gálico.....	5
2. Estructura química de penta-galoil-glucosa (A) y mono-galoil-glucosa (B).	6
3. Estructura química de ácido gálico (A), pirogalol (B), catecol (C), resorcinol (D), metil galato (E) y 4- <i>O</i> -metil ácido gálico (F).	7
4. Curva estándar de ácido gálico con el método rodanina de 0 a 100 ppm.	8
5. Límite inferior de detección de ácido gálico con el método rodanina.	9
6. Liberación de ácido gálico mediante hidrólisis enzimática usando tanin acil hidrolasa en penta-galoil-glucosa.	10
7. Cromatograma de hidrólisis de penta-galoil-glucosa incubado 0 min (A), 30 min (B) y 120 min (C) con tanin acil hidrolasa a 10^{-3} U/ml.....	12
8. Liberación de ácido gálico mediante hidrólisis enzimática usando tanin acil hidrolasa en mono-galoil-glucosa.....	13
9. Cromatograma de hidrólisis de mono-galoil-glucosa incubado 30 min (A) y 120 min (B) con tanin acil hidrolasa a 10^{-3} U/ml.....	14
10. Hidrólisis de penta-galoil-glucosa con tanasa presente en superficie de mango a 0 min (A) y 120 min (B).	16
Anexos	Página
1. Estructura química tentativa para los siete metabolitos urinarios derivados de ácido gálico.....	24
2. Ensayo rodanina a concentración de 0 a 100 ppm de ácido tánico.	25
3. Ensayo rodanina a concentraciones de 6 a 100 ppm de ácido gálico.	25
4. Prueba rápida rodanina a diferentes concentraciones de ácido gálico.....	26
5. Tiras de prueba rápida de rodanina a diferentes concentraciones de ácido gálico	26

1. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica*) es considerado una de las frutas tropicales más importantes en el mundo con una producción global que excede los 42.5 millones de toneladas. (FAOSTAT 2014). Se han identificado más de 1000 variedades de mango alrededor del mundo y su producción de manera comercial está reportada en 87 países (Tharanathan 2006). India ocupa el primer lugar en producción con 18 millones de toneladas, seguido de China, Tailandia, Indonesia y México (FAOSTAT 2014).

La cantidad de mango fresco que Estados Unidos importa se ha duplicado desde el año 2000, esto debido al incremento en la preocupación por parte de la población en consumir alimentos considerados saludables (WHO 2013). Estudios relacionan el consumo de mango con actividad anticancerígena, porque dentro de los compuestos que le constituyen se pueden encontrar ácidos: gálico, málico y palmítico así como vitamina C y vitamina A en altas concentraciones (Anjaneyulu *et al.* 1994). Los polifenoles provenientes del mango han sido atribuidos de tener actividad antiinflamatoria y potencial para combatir enfermedades degenerativas (Masibo y He 2008, Sellés *et al.* 2015). También los taninos de gran masa molecular se encuentran predominantes, por tanto, es considerado buena fuente de antioxidantes, capaces de neutralizar radicales libres y brindar al cuerpo una defensa contra la degradación de las células (Muhammad *et al.* 2010).

Se denominan taninos a polifenoles naturales que son metabolitos secundarios en algunas plantas. Son solubles en agua, capaces de formar complejos con las proteínas confiriéndoles astringencia como característica gustativa (Zamora *et al.* 2014). También poseen un poder de consumir oxígeno disuelto, de ahí su capacidad antioxidante (Muñoz *et al.* 2007). Los taninos se clasifican en taninos condensados, que 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 (Álvarez 2011).

Los galotaninos son las formas más simples de taninos hidrolizables presentes en el mango (Talcott y Talcott 2009); son esterificaciones de ácidos gálicos unidos entre sí por enlaces éster entre el carboxilo de uno de ellos y el -OH del otro. Éstos a su vez están unidos a glucosa con un enlace anomérico beta (Arapitsas 2012). La β -glucogalina es la forma más simple del galotanino y de aquí parte la síntesis de otros más complejos como penta-galoil-glucosa. Los enlaces formados entre dos ácidos gálicos son llamados depsídicos (Olivas *et al.* 2015).

Una forma de romper los enlaces depsídicos es la enzimática. Tanasa (Tanin Acil Hidrolasa EC 3.1.1.20) es una enzima capaz de romper estos enlaces y los enlaces éster de

taninos hidrolizables, obteniendo como productos ácido gálico y glucosa (Lekha y Lonsane 1997). Esta enzima tiene una amplia aplicación en la industria de los alimentos y bebidas ya que es capaz de eliminar efectos indeseables causados por la presencia de taninos y a la vez resaltar propiedades antioxidantes y nutricionales (Aguilar *et al.* 2007). Tanasa es utilizada para clarificación de cerveza y jugos de frutas, en bebidas de café, para la prevención de sabores astringentes en vinos, jugos y té instantáneo (Baik *et al.* 2015).

Debido al realce en importancia que la tanasa está teniendo, se están haciendo estudios para encontrar nuevas fuentes con las propiedades adecuadas para la aplicación en la industria (Mandal y Ghosh 2013). Así también, para su purificación y evaluación se requiere de métodos que sean sensibles, reproducibles y convenientes (Aguilar *et al.* 1999). La identificación de actividad de tanasa es posible con métodos como la cromatografía líquida, que mide la liberación de ácido gálico u otros componentes luego de la acción enzimática (Xia *et al.* 2016). Estos métodos aunque específicos y reproducibles no son convenientes debido a que requieren de equipos sofisticados, tiempo e inversión económica para analizar cada muestra (Sharma *et al.* 2000).

Rodanina (dimetilaminobenzilidina) es un reactivo cuya estructura es capaz de reaccionar con los hidroxilos del ácido gálico formando un complejo de color rosado. Éste complejo es fácilmente detectable y su absorbancia máxima se encuentra a 520 nm de longitud de onda (Enemuor y Odibo 2009). En estudios realizados por Inoeu y Hagerman (1988) se encontró el primer método para la estimación de galotaninos, el cual consistía en una hidrólisis ácida y la formación del complejo rodanina-ácido gálico. Este método es fiable para análisis de rutina tanto cualitativos como cuantitativos, es específico, no tiene interferencias con otros fenoles y presenta una alta sensibilidad y precisión.

Éste estudio se fundamentó en la evaluación y utilización del ensayo rodanina como parte del estudio del mecanismo de acción de la enzima tanasa sobre penta-galoil-glucosa y mono-galoil-glucosa, comúnmente encontrados en mango (*Mangifera indica*). Es por esto que los objetivos fueron:

- Comprobar la efectividad, especificidad y límites de detección del ensayo rodanina.
- Evaluar la hidrólisis enzimática a través del tiempo en compuestos de mango haciendo uso de tanasa mediante el método de rodanina y el método por cromatografía líquida (LC-MS).
- Evaluar otras posibles aplicaciones del ensayo rápido con rodanina en áreas de agricultura y nutrición.

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 los Alimentos en Texas A&M University, College Station, Texas-Estados Unidos.

Ensayo rodanina. Se prepararon diferentes concentraciones de estándares de ácido gálico, ácido tánico, mono-galoil-glucosa (MGG), penta-galoil-glucosa (PGG), Metil ácido gálico, 4-O-metil ácido gálico y pirogalol todos obtenidos de Sigma-Aldrich®. Para esto, se preparó una concentración conocida de cada estándar (200 ppm en H₂O 0.1% ácido fórmico) y se diluyó (6X) y a cada dilución se le realizó el ensayo rodanina.

El ensayo rodanina se efectuó de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se agregaron 0.4 ml de muestra y 0.6 ml de solución de rodanina (0.667% en metanol) y se esperó 10 min. Se agregó 0.4 ml de base NaOH 0.5 M y se esperó 15 min. Se completó el volumen final a 10 ml con agua para diluir la solución y se leyó la absorbancia a 520 nm de longitud de onda. Ésta absorbancia se correlacionó con una curva estándar para obtener mg/L eqq ácido gálico como resultado.

Solución enzimática e hidrólisis. Se utilizó la enzima tanin acil hidrolasa, EC 3.1.1.20 (tanasa) de *Aspergillus oryzae*. Se preparó en buffer citrato 0.5 M a 5.5 pH, a concentración de 10⁻³ U/ml. Esta solución se preparó al momento de efectuar la hidrólisis. Se usó la solución de enzima ya preparada (100 µl) que se mezcló con soluciones de monogaloil glucosa (MGG) y pentagaloil glucosa (PPG) a 200 ppm (250 µl) y buffer citrato 0.5 M (650 µl). Se incubaron a 30 °C por 0, 1, 2, 3, 5, 10, 30, 60, 90 y 120 min el PGG y 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 180, y 240 min el MGG y se detuvo la reacción enzimática añadiendo metanol (1 ml). Esta solución fue analizada mediante el método rodanina y con cromatografía líquida (LC-MS).

Diseño del estudio. Para el estudio de hidrólisis enzimática se utilizó los tiempos sobre PGG y MGG utilizando un diseño completamente al azar (DCA) para analizar el efecto del tiempo sobre la hidrólisis con separación de medias DUNCAN. Para la prueba de resistencia de alcohol se utilizaron tres diferentes alcoholes metanol, 2-propanol y etanol y concentraciones de enzima de 1 y 10⁻³ U/ml siendo un arreglo factorial con dos variables.

Caracterización y cuantificación de compuestos con MS-LC. Todas las muestras fueron filtradas con un filtro de 0.45 μm y colocadas en viales de 1.5 ml para ser 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 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 ESI trabajo en modo negativo. Todos los compuestos fueron cuantificados a 280 nm de longitud de onda.

Resistencia de tanasa al alcohol. En un tubo de ensayo se agregaron 200 μl de alcohol (metanol, etanol o isopropanol) y 100 μl de enzima tanasa según tratamientos y se esperó 5 min. Se agregaron 100 μl de ácido tánico a 250 ppm y se esperó 1 min. Luego se realizó el ensayo rodanina con dilución en agua de 5 ml.

La prueba con los hisopos consistió en sumergir el hisopo en alcohol y luego en una solución de enzima tanasa 1 U/ml y se dejó secar por 1.5 horas. Se colocó el hisopo en 400 μl de solución de ácido tánico 200 ppm y se esperó 1 min, se sacó el hisopo y se realizó el ensayo rodanina.

Muestreo de tanasa en campo. Se sumergió un hisopo en alcohol 70%. Se tomó la muestra de la superficie de mangos maduros (centro, pedúnculo, puntos negros). Se introdujo el hisopo en un tubo de ensayo con 400 μl de ácido tánico (50 mg/L) y se dejó actuar por 10 minutos. Se agregó rodanina (600 μl) y 10 min después se agregó 400 μl de base 0.5 M NaOH. Se observó el color.

Hidrólisis de muestras de orina. Se mezclaron 500 μl de muestra y 500 μl de HCl 5 N por 40 min y por 19 horas. Se hizo una combinación con tratamiento de calor en la que se mantuvieron las muestras con HCL 5 N una hora en agua a punto de ebullición. Luego a todas las muestras se les hizo el ensayo rodanina.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Evaluación de aplicabilidad del método rodanina. Existe un reactivo llamado rodanina que reacciona con ácido gálico, formando un compuesto de color rosado al elevar el pH que se detecta a 520 nm de longitud de onda (Sharma *et al.* 2000). Este reactivo (2-Thioxo-4-thiazolidinone) y sus derivados han sido de interés en la investigación ya que poseen actividad antimicrobiana y antiviral (Ozkan *et al.* 2015). Así mismo, ciertos estudios lo han identificado como un potencial agente rector en ensayos para la determinación de galotaninos, ácido gálico y reacciones enzimáticas con tanasa (Sharma *et al.* 2000, Enemuor y Odibo 2009).

Rodanina formó un complejo de color rosado con el ácido gálico tal y como indicaron Inoeu y Hagerman (1988). Se monitoreó la absorbancia a 520 nm de longitud de onda del complejo de color en el espectrofotómetro a diferentes concentraciones de ácido gálico. Se observó que el complejo de color fue estable después de formado al menos por 40 min (Figura 1). El complejo fue estable independientemente de la concentración de ácido gálico que había en solución. Esto es de beneficio para los investigadores ya que reduce la variabilidad de resultados entre muestras cuando son muy numerosas, por el hecho de que aún cuando se tome tiempo hasta analizar la última muestra, ésta no habrá cambiado su resultado sin importar la concentración de la misma.

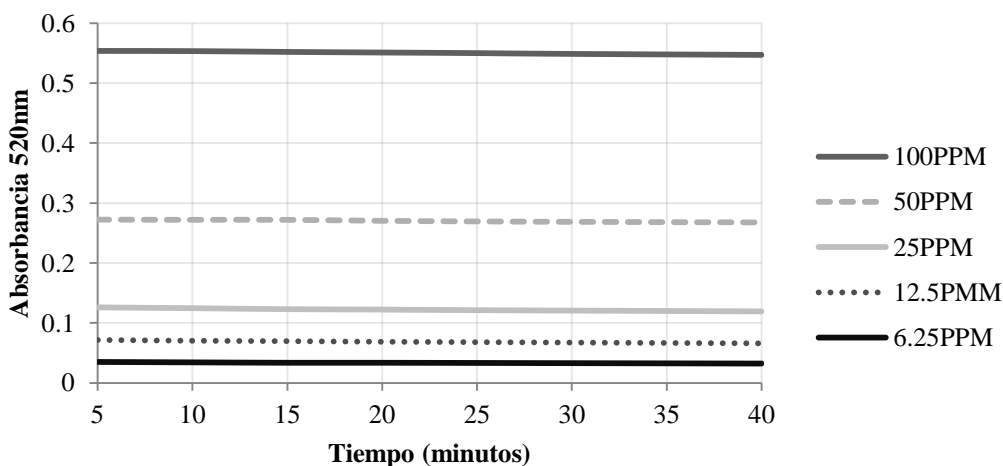


Figura 1. Estabilidad de complejo de color rodanina-ácido gálico.

En este estudio se realizó el ensayo rodanina a varios compuestos, entre ellos los compuestos de mango MGG y PGG (Figura 2). Se observó la generación de un color

amarillo para PGG y naranja para MGG. Estos colores generan mayor absorbancia a longitudes de onda entre 430 y 490 nm (Díaz *et al.* 2005) las cuales son más bajas a la que se leyó (520 nm). Al tener un nivel de absorbancia mínimo se indicó como resultado negativo. Es necesario un ambiente alcalino para generar la formación de color del ácido gálico con rodanina. La generación de color amarillo y naranja se dió por el aumento de pH a 10.0 al agregar NaOH; ya que, cuando compuestos fenólicos libres son expuestos a pH alcalino estos se vuelven inestables y se degradan de manera irreversible (Friedman y Jürgens 2000). Sin embargo, es necesario destacar que se observó una absorbancia con MGG y PGG que aumentó a medida aumentó la concentración de los compuestos en el ensayo. Esto pudo deberse a la agregación de las moléculas en solución por su alta concentración que impiden el paso de la luz y por ende generan absorbancia (Allen *et al.* 2010).

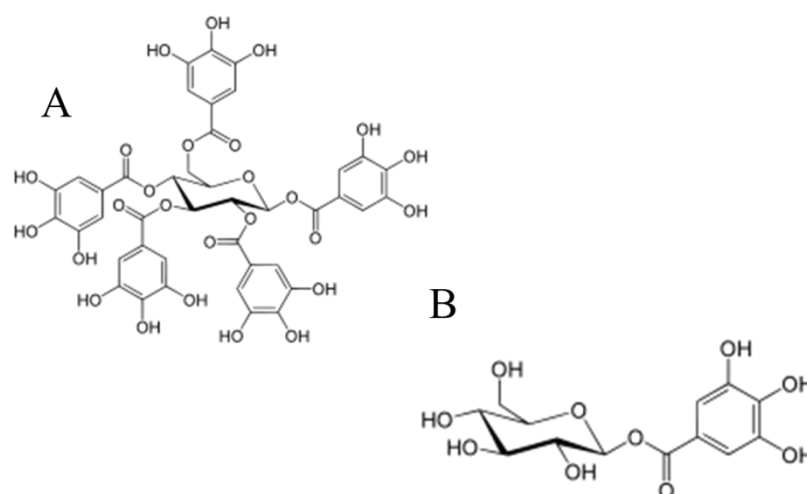


Figura 2. Estructura química de penta-galoil-glucosa (A) y mono-galoil-glucosa (B).
Fuente: Torres 2011

Se realizó el ensayo rodanina con compuestos fenólicos y metabolitos (Cuadro 1). Se encontró una reacción positiva con pirogalol (Figura 3B), que es un metabolito de ácido gálico. La estructura de pirogalol es similar al ácido gálico excepto porque ha perdido el grupo ácido. Se obtuvo una absorbancia de 0.929 al formar un complejo de color rodanina-pirogalol, esto fue mayor al 0.551 de absorbancia que se obtuvo de ácido gálico. No hay estudios que evidencien la forma como rodanina reacciona con los compuestos. Sin embargo, se puede inferir que el mecanismo de reacción de rodanina es mediante enlaces en los tres hidroxilos vicinales presentes tanto en ácido gálico como en pirogalol.

Para confirmar ésta hipótesis se realizaron pruebas con catecol y resorcinol (Figura 3C y 3D). No se observó ninguna generación de complejo de color en ninguno de los anteriores. Se realizó el ensayo rodanina con metil galato y 4-O-metil ácido gálico (Figura 3E y 3F), los cuales poseen un grupo metil en el ácido y cuarto carbono, respectivamente. No se observó ninguna formación de color rosado. Por primera vez a conocimiento del

autor, se identifica que la reacción de rodanina requiere de tres hidroxilos en un anillo benceno y que la presencia de un radical metilo interfiere en la formación del complejo.

Cuadro 1. Ensayo rodanina con diferentes compuestos fenólicos y metabolitos.

Compuesto (100ppm)	Color	Absorbancia 520nm
Ácido gálico	Rosado	0.551
Mono-galoil-glucosa	Naranja	0.017
Penta-galoil-glucosa	Amarillo	0.025
Pirogalol	Rosado	0.929
Metil galato	Amarillo	0.012
4-O-metil ácido gálico	Cristalino	0.000
Catecol	Cristalino	0.000
Resorcinol	Cristalino	0.000
Acido tánico	Rojo	0.098

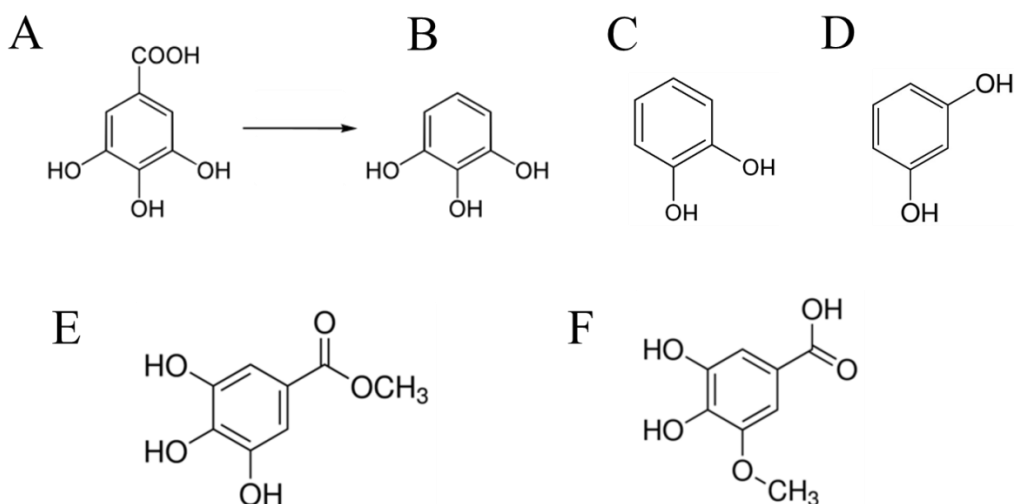


Figura 3. Estructura química de ácido gálico (A), pirogalol (B), catecol (C), resorcinol (D), metil galato (E) y 4-O-metil ácido gálico (F).

Se debe destacar que el ácido tánico presentó una reacción color rojo, sin embargo, este resultado se debe tomar como negativo ya que no es el color característico que representa el complejo de color rodanina-ácido gálico. Esta presencia de color se puede deber a que el ácido tánico contiene taninos hidrolizables de todos tamaños desde monómeros de ácido gálico hasta polímeros más complejos (Rodríguez *et al.* 2008). Se han encontrado picos de ácido gálico en cromatogramas realizados a diferentes soluciones de ácido tánico lo que indica la impureza de los aislados (Sharma 1998). Al elevarse el pH y los otros compuestos degradarse, se pudo generar una combinación de color naranja-amarillo con el rosado resultando en un rojo que produce absorbancia a 520nm. Marcar esta diferencia de color es sustancial ya que al hacer ensayos con tanasa usando como sustrato ácido

tánico se pueden tener problemas con blancos con absorbancias demasiado altas. Por estos problemas, ensayos con tanasa se a usado con metil galato como sustrato (Chang *et al.* 2006). Metil galato (Figura 3E) se tornó color amarillo al presentar resultados rodanina negativo (Cuadro 1). Lo cual es una ventaja a comparación de ácido tánico, ya que fácilmente se podría diferenciar un blanco y/o resultado negativo.

Para futuras aplicaciones del ensayo rodanina se creyó conveniente identificar el rango de detección del ensayo. El límite de concentración máximo de ácido gálico con el que trabaja el ensayo es de importancia para poder obtener resultados exactos; es necesario diluir algunas muestras para llegar al rango deseable. El rango de comportamiento lineal del método rodanina fue hasta 100 ppm de ácido gálico (Figura 4). Con concentraciones mayores a 100 ppm se comenzó a observar una sobrevaloración de la absorbancia, lo cual ya no permite realizar una regresión lineal porque habría una sobreestimación del resultado. El límite de detección mínimo de ensayo rodanina permitiría evaluar su viabilidad cuando la concentración que se está buscando analizar es baja, por ejemplo en muestras biológicas donde se encuentra ácido gálico en concentraciones de partes por billón (Shahrzad y Bitsch 1998). Lograr una detección a tan bajos niveles de concentración es posible, pero para una cuantificación sí es necesario hacer uso de otros métodos más sofisticados en este caso HPLC que requieren mayor tiempo y recursos que un método espectrofotométrico (Shahrzad *et al.* 2001).

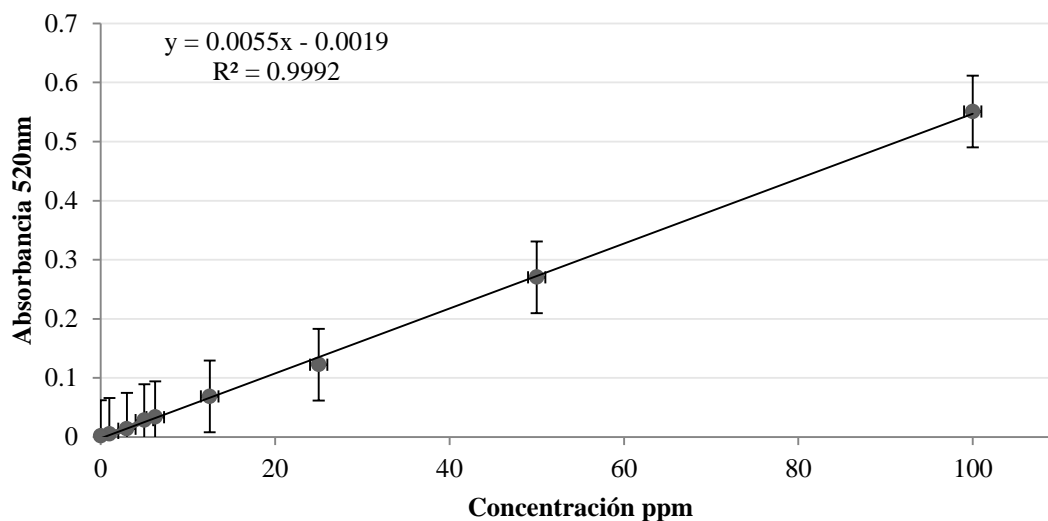


Figura 4. Curva estándar de ácido gálico con el método rodanina de 0 a 100 ppm.

El límite de detección de ácido gálico del ensayo fue 0.5 ppm (Figura 5). Cuando se comenzó a superar los límites del equipo con concentraciones bajas, no fue posible obtener una curva estándar con linealidad extrapolable. A concentraciones menores a 1 ppm la reacción que se logró con rodanina para formar el complejo de color no fue suficiente para diferenciar concentración. Es decir, la misma absorbancia obtenida para

1 ppm fue obtenida para 0.5 ppm. Lo que indica que aunque se pudo detectar la presencia de ácido gálico no sería posible cuantificarlo con exactitud.

El costo de análisis en equipos sofisticados como cromatografía líquida es variante; depende de aspectos como número de muestras corridas en un año, modelo de los equipos, tipo de muestra, mano de obra de laboratorio entre otros (Snyder *et al.* 1997). Una compañía podría gastar aproximadamente 250 dólares por muestra analizada en HPLC-MS tomando en cuenta todo lo mencionado anteriormente. Una sola muestra corrida en HPLC-MS puede tardar hasta 70 min. En su contraste, un frasco de reactivo rodanina de 25 g se encuentra en el mercado a 51 dólares (Sigma-Aldrich® 2016). De este frasco se puede preparar la solución con base metanol que rinde para 6,150 muestras, lo que se traduce en un costo de centavos de dólar por muestra analizada. Adicionalmente, no se requiere mano de obra calificada para realizar el ensayo como en el caso de cromatografía líquida. Por último, el tiempo de evaluación para una gradilla de muestras (72 tubos) es de 25-30 min en total.

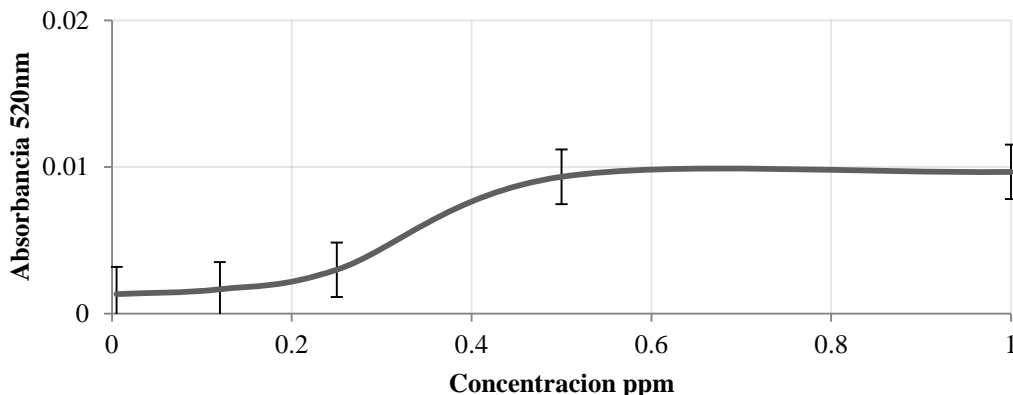


Figura 5. Límite inferior de detección de ácido gálico con el método rodanina.

Fase II. Determinación de la hidrólisis enzimática de MGG y PGG mediante el ensayo rodanina y HPLC-MS. Durante este estudio se realizó el monitoreo de la acción de la enzima tanasa en PGG a través del tiempo haciendo uso del ensayo rodanina en la cuantificación del ácido gálico liberado (Figura 6). Se pudo observar un incremento en la concentración de ácido gálico a partir del minuto 10 y hasta el minuto 120. Este incremento se debe a que la enzima tiene como mecanismo de acción liberar los enlaces ésteres, o sea enlaces entre ácidos gálicos y glucosa presentes en los galotánicos (Kumar *et al.* 2006). Sin embargo, la producción de ácido gálico no se detuvo, lo que significa que la hidrólisis no llegó a su finalización.

La velocidad a la cual se da ésta reacción es determinada por factores como concentración de la enzima (U/ml), pH de la reacción, concentración del sustrato, temperatura del medio y presencia o ausencia de iones metálicos. Estos factores a su vez dependen de la fuente de la cual se obtuvo la enzima así como su método de aislamiento y tiempo de cultivo (Rana y Bhat 2005). La utilización del método rodanina para monitorear una hidrólisis de

PGG fue efectiva para cuantificar ácido gálico. Sin embargo, los compuestos intermedios que se generaron se quedaron sin considerar.

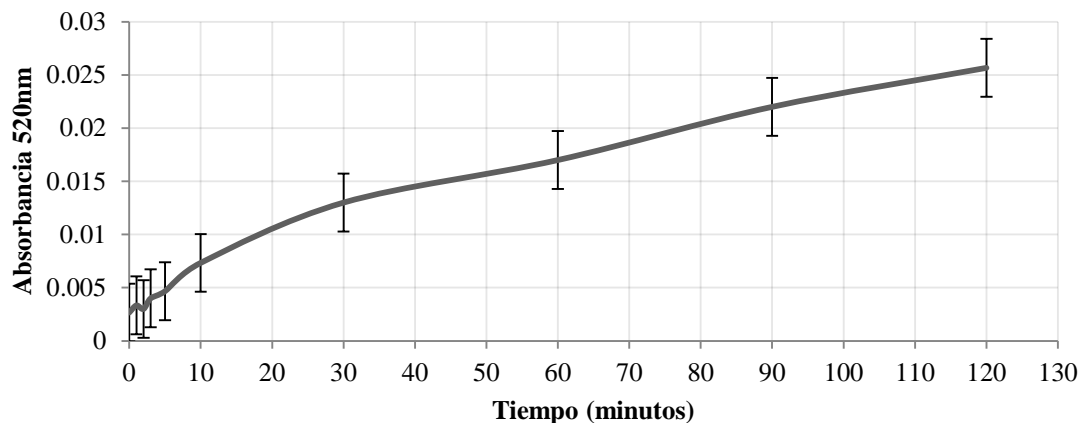


Figura 6. Liberación de ácido gálico mediante hidrólisis enzimática usando tanin acil hidrolasa en penta-galoil-glucosa.

La hidrólisis enzimática de PGG es diferente a la de otros compuestos en general, por el hecho de que a medida se va generando la reacción se va obteniendo más sustrato. Mediante LC-MS se identificó únicamente PGG en base al estándar a los 0 min (Figura 7A), confirmando el resultado negativo que se obtuvo con rodanina. A los 30 min de hidrólisis se identificó un nuevo compuesto tetra-galoil-glucosa (4GG) (Figura 7B). La identificación de éste se hizo mediante fragmentación con la técnica de ionización por electrospray en espectrografía de masa. La cual consiste en la fragmentación e identificación por peso de iones generados a partir del compuesto. 4GG presentó un ion masa-carga (m/z) de 787 y una fragmentación de iones con una reducción de 170 Da y 152 Da correspondientes a la pérdida de un ácido gálico y una fracción galoil respectivamente el cual coincide con Berardini *et al.* (2004). También apareció un pico de ácido gálico libre, confirmando el resultado positivo que se obtuvo con el ensayo rodanina. Se identificó como ácido gálico con un ion de 169.2 m/z seguido de una pérdida en MS_2 que resultó en pirogalol con 125.3 m/z al igual que Krenek *et al.* (2014). Se identificó un compuesto como MGG 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 de la columna (Bowe *et al.* 1997). MGG mostró un ion de 331.2 m/z y una fragmentación con una pérdida de 162 Da correspondiente al radical glucosa.

Se pudieron identificar tetra, tri y di galoil glucosa en cromatogramas realizados a 120 min de incubación de PGG con tanasa (Figura 7C). Esto confirma que la enzima va generando ácido gálico libre y también compuestos galoil-glucosa más pequeños que eventualmente irá hidrolizando. La presencia de estos compuestos indicó que la hidrólisis a 120 min no estuvo a término.

Se observó un cambio en el tiempo de retención del ácido gálico en 30 min de hidrólisis con respecto a 120 min, éste paso de 13.2 min a 12.2 min 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 (Beyaz *et al.* 2014).

Se compararon los resultados de la cuantificación de ácido gálico en mg/L luego de hidrólisis con rodanina y los valores obtenidos mediante HPLC y se determinó que fueron diferentes ($P < 0.05$) (Cuadro 2). Se identificó como limitante que el método rodanina presentó valores de absorbancia al minuto 0 de hidrólisis y hasta el min 10. Estos valores fueron resultado de la concentración de PGG que se encontraba en solución. Es necesario tomar esa absorbancia en cuenta para evitar la sobre estimación al calcular la concentración de ácido gálico. Se debe destacar que a medida avanzó el tiempo de hidrólisis la concentración de PGG en solución fue disminuyendo, pero otros nuevos compuestos se fueron generando. Lo que podría hacer difícil la cuantificación exacta de la base y por ende no poder corregir las lecturas de absorbancia para obtener los valores exactos.

Adicionalmente, se confirmó el límite mínimo de detección del ensayo rodanina de 1 mg/L de ácido gálico (Fase I). El HPLC siendo un equipo mucho más sensible que el ensayo (De Mesquita *et al.* 2015) detectó ácido gálico en los minutos 1, 2, 3 y 5 en concentraciones menores a 1 mg/L. En contraste, el ensayo no mostró cambios de absorbancia que determinó en los mismos minutos un resultado de 0 mg/L.

Cuadro 2. Concentración de ácido gálico luego de hidrólisis de penta-galoil-glucosa haciendo uso de tanasa a 10^{-3} U/ml medido mediante ensayo rodanina y HPLC-MS.

Tiempo (minutos)	Rodanina (mg/L)	HPLC-MS (mg/L)
0	$1.00^{*} \pm 0.12^{az(a)}$	$0.00 \pm 0.00^{z(b)}$
1	$1.25 \pm 0.12^{z(a)}$	$0.43 \pm 0.02^{y(b)}$
2	$1.12 \pm 0.00^{z(a)}$	$0.64 \pm 0.02^{x(b)}$
3	$1.50 \pm 0.00^{yz(a)}$	$0.76 \pm 0.01^{w(b)}$
5	$1.75 \pm 0.12^{yz(a)}$	$1.08 \pm 0.02^{v(b)}$
10	$2.74 \pm 0.12^{y(a)}$	$2.00 \pm 0.10^{u(b)}$
30	$4.86 \pm 0.37^{x(a)}$	$4.61 \pm 0.00^{t(b)}$
60	$6.36 \pm 0.37^{w(a)}$	$6.27 \pm 0.03^{s(b)}$
90	$8.23 \pm 0.75^{v(a)}$	$7.91 \pm 0.22^{r(b)}$
120	$9.60 \pm 1.00^{u(a)}$	$8.23 \pm 0.10^{q(b)}$

Letras distintas (a-b) en la misma fila indican diferencia estadística ($P < 0.05$) *media aritmética, ^αdesviación estándar, letras distintas (q-z) en la misma columna indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

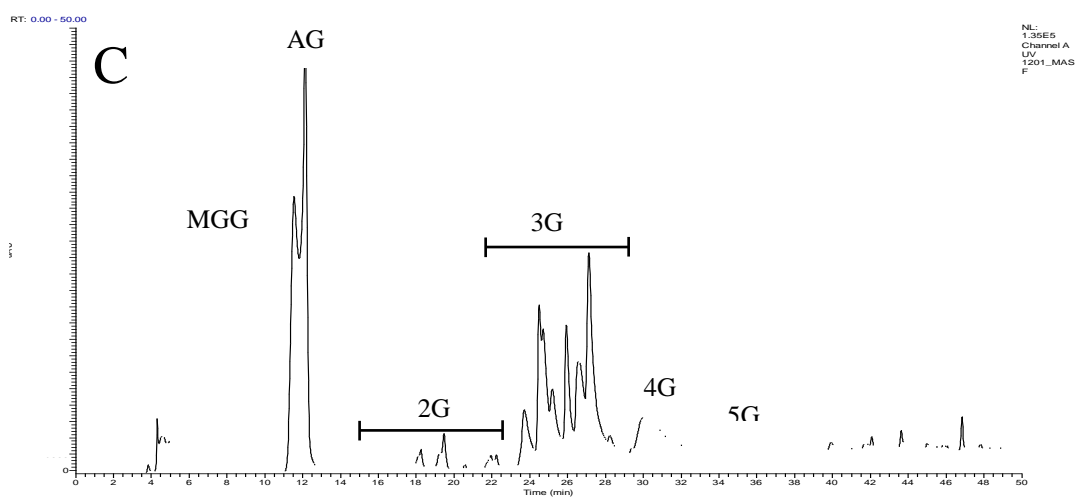
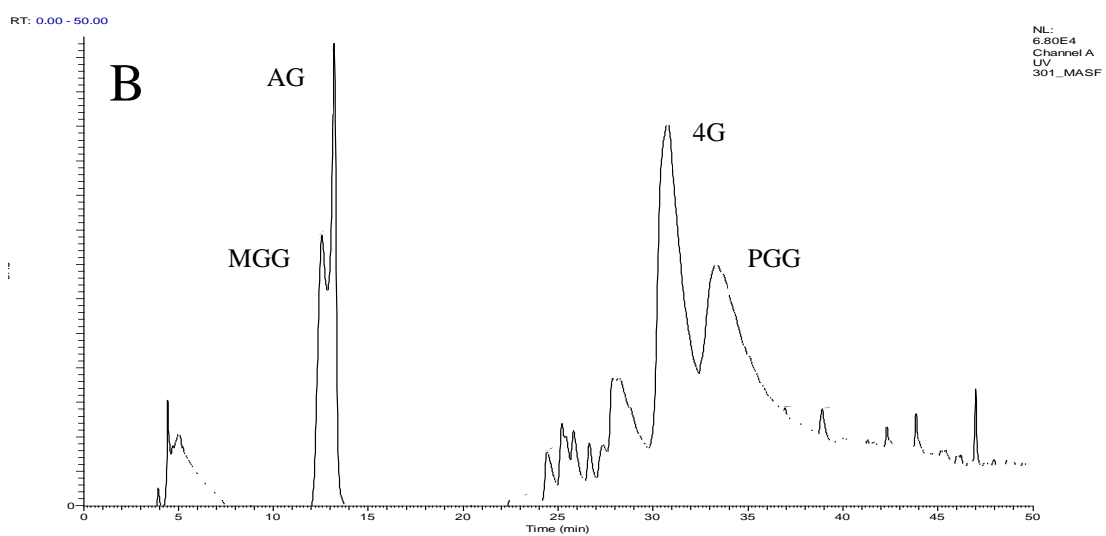
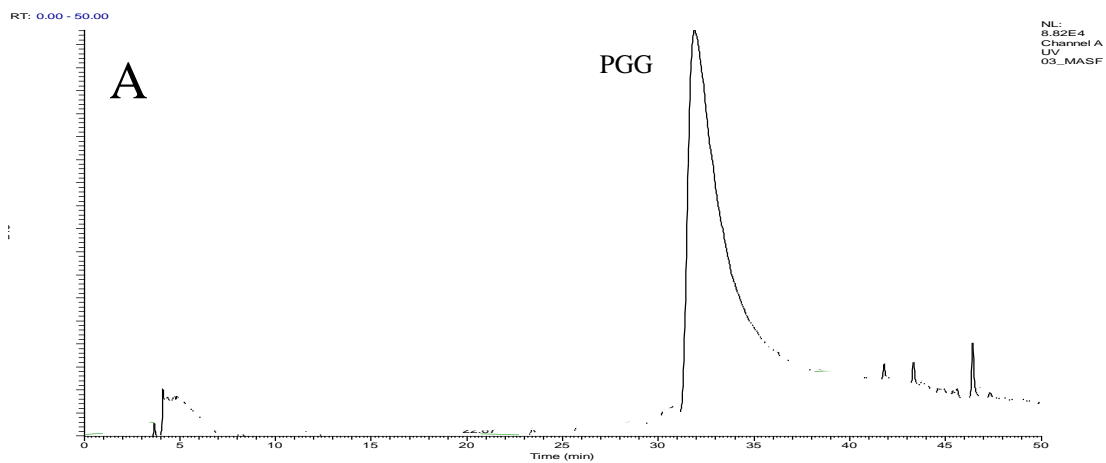


Figura 7. Cromatograma de hidrólisis de penta-galoil-glucosa incubado 0 min (A), 30 min (B) y 120 min (C) con tanin acil hidrolasa a 10^{-3} U/ml.

El MGG es el más simple de los galotaninos y tan solo es una unidad galoil esterificada o eterificada a un núcleo de glucosa (Belmares *et al.* 2004). La actividad de tanasa varía según el sustrato con el que se encuentra (Wu *et al.* 2015). La hidrólisis utilizando tanasa sobre este compuesto mostró una velocidad menor de reacción que con el PGG. Se observó un aumento significativo en la producción de ácido gálico a partir del minuto 60 y hasta el 180 (Figura 7). Autores reportan que tanasa al encontrarse solamente con MGG tarda más tiempo en identificar el último enlace de ácido gálico presente en la estructura (Krenek *et al.* 2014). Esta diferencia en tiempo podría deberse a diferentes sitios activos para cada enlace galoil glucosa.

Se observó mediante rodanina la detención de generación de ácido gálico a partir de los 180 min hasta los 240 min que se hizo el experimento. Si la reacción dejó de generar ácido gálico se podría asumir que todo el MGG fue hidrolizado y que se completó la reacción. Adicionalmente, la exposición a concentraciones de ácido gálico por tiempo prolongado puede hacer que el sitio activo de la tanasa sea ocupado y que se impida un verdadero complejo enzima sustrato dando como resultado la detención de la actividad (Albertse 2002).

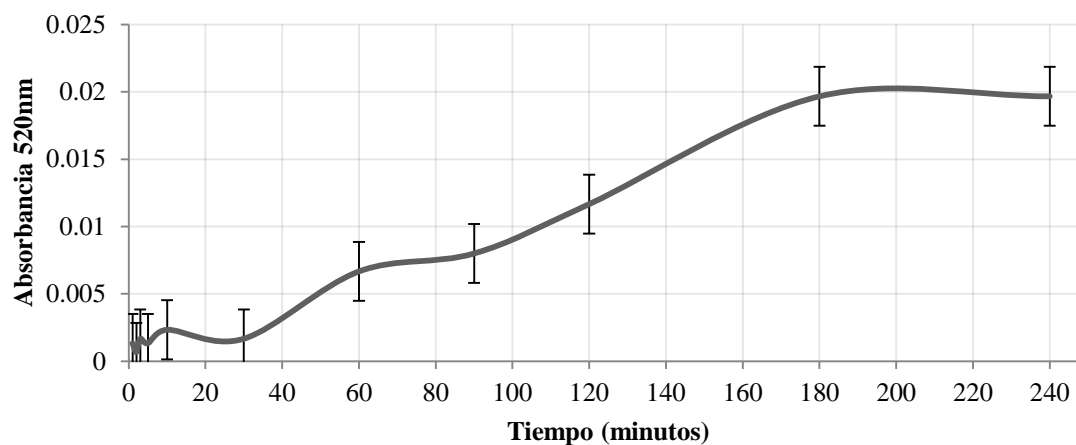


Figura 8. Liberación de ácido gálico mediante hidrólisis enzimática usando tanin acil hidrolasa en mono-galoil-glucosa.

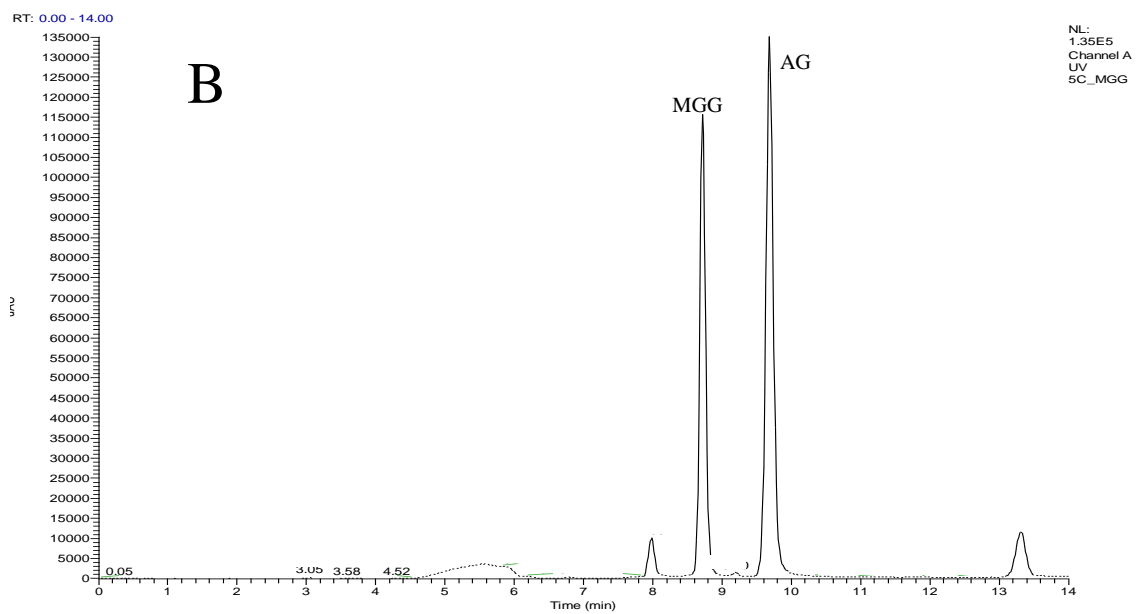
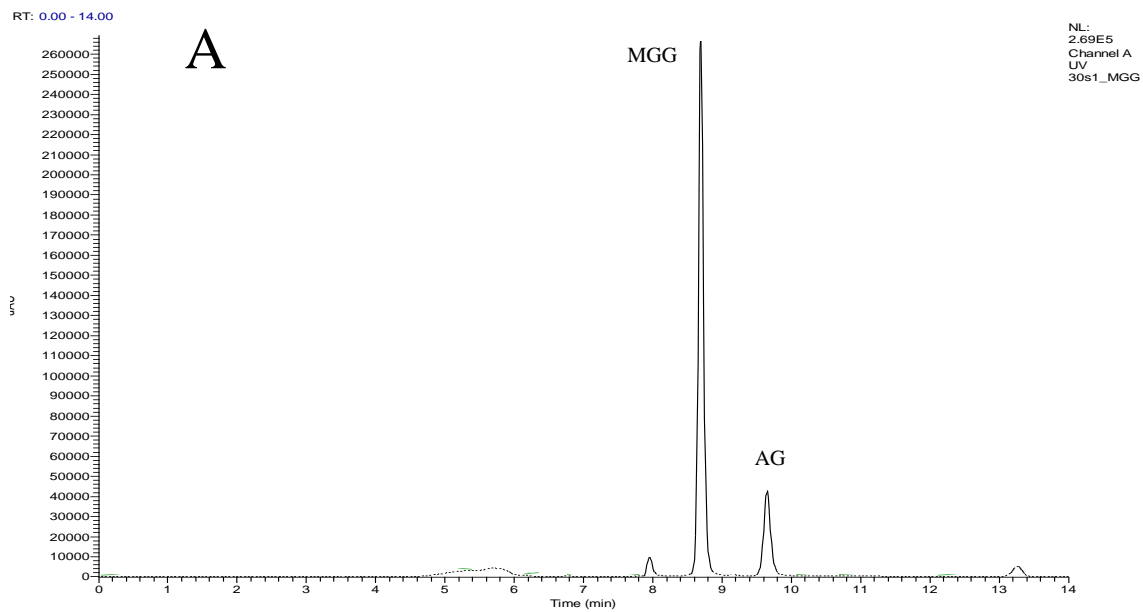


Figura 9. Cromatograma de hidrólisis de mono-galoil-glucosa incubado 30 min (A) y 120 min (B) con tanin acil hidrolasa a 10^{-3} U/ml.

Cuadro 3. Concentración de ácido gálico luego de hidrólisis de mono-galoil-glucosa haciendo uso de tanasa a 10⁻³ U/ml medido mediante ensayo rodanina y HPLC-MS.

Tiempo (minutos)	Rodanina (mg/L)	HPLC-MS (mg/L)
0	0.00 [*] ± 0.00 ^{az}	ND
1	0.50 ± 0.25 ^z	ND
2	0.25 ± 0.12 ^z	ND
3	0.62 ± 0.12 ^z	ND
5	0.50 ± 0.12 ^z	ND
10	0.87 ± 0.33 ^{z(a)}	0.45 ± 0.00 ^{z(b)}
30	0.62 ± 0.12 ^{z(a)}	1.11 ± 0.03 ^{y(b)}
60	2.49 ± 0.45 ^{y(a)}	2.39 ± 0.03 ^{x(b)}
90	2.99 ± 0.22 ^{x(a)}	3.10 ± 0.13 ^{w(b)}
120	4.36 ± 0.12 ^{w(a)}	4.26 ± 0.04 ^{v(b)}
180	7.35 ± 0.66 ^{v(a)}	5.61 ± 0.16 ^{u(b)}
240	7.35 ± 0.12 ^{v(a)}	6.95 ± 0.29 ^{t(b)}

Letras distintas (a-b) en la misma fila indican diferencia estadística (P<0.05) * media aritmética, ^α desviación estándar, letras distintas (t-z) en la misma columna indican diferencia estadística (P<0.05). ND: No se detectó.

Fase III. Aplicación de método rodanina en la investigación en campo y nutrición humana. Se identificó la presencia de enzima tanasa en la superficie de mangos comerciales. En un estudio realizado por Sirven (2016) simplemente con sumergir mangos en buffer de citrato se determinó la presencia de actividad enzimática mediante HPLC-MS (Figura 10). Al minuto 120 hubo un aumento en la concentración de ácido gálico y una descomposición de PGG en compuestos menores, mecanismo que ya se discutió en la sección anterior (Fase II).

Conocer la resistencia que presenta la enzima tanasa a concentraciones de alcohol por cierto tiempo es relevante para desarrollar protocolos de muestreo. Identificar fuentes de tanasa en superficies de frutas, específicamente mango, requeriría tomar una muestra estéril que no afecte su actividad. En este estudio se observó una completa inhibición de actividad con metanol (Cuadro 4), confirmando otros estudios en los que se utilizó metanol para detener dicha enzima (Xiao-Wei y Yong-Quan 2006). Para determinar si la actividad se dio o se inhibió, se tomó en cuenta la concentración final de ácido tánico. Como se discutió anteriormente (Fase I), el ácido tánico genera color y absorbancia por tal razón se debe considerar una base/blanco que se resta del resultado obtenido en el experimento. El alcohol isopropílico (2-propanol), inhibió actividad enzimática a comparación del control pero se generó una actividad suficiente para generar ácido gálico y por ende aumentar la absorbancia obtenida. El etanol inhibió por completo al encontrarse con una baja concentración de enzima. En concentraciones más altas de enzima el etanol no detuvo su actividad y se observó un resultado rodanina positivo. La tanasa por su alto contenido de azúcares en su estructura, que puede estar entre un 11 y 64%, puede presentar cierta resistencia a degradación o precipitación (Kasieczka-Burnecka et al. 2007). Esta resistencia difirió con los distintos alcoholes al que se expuso, probablemente por desigualdad en estructura interactuaron de forma diferente.

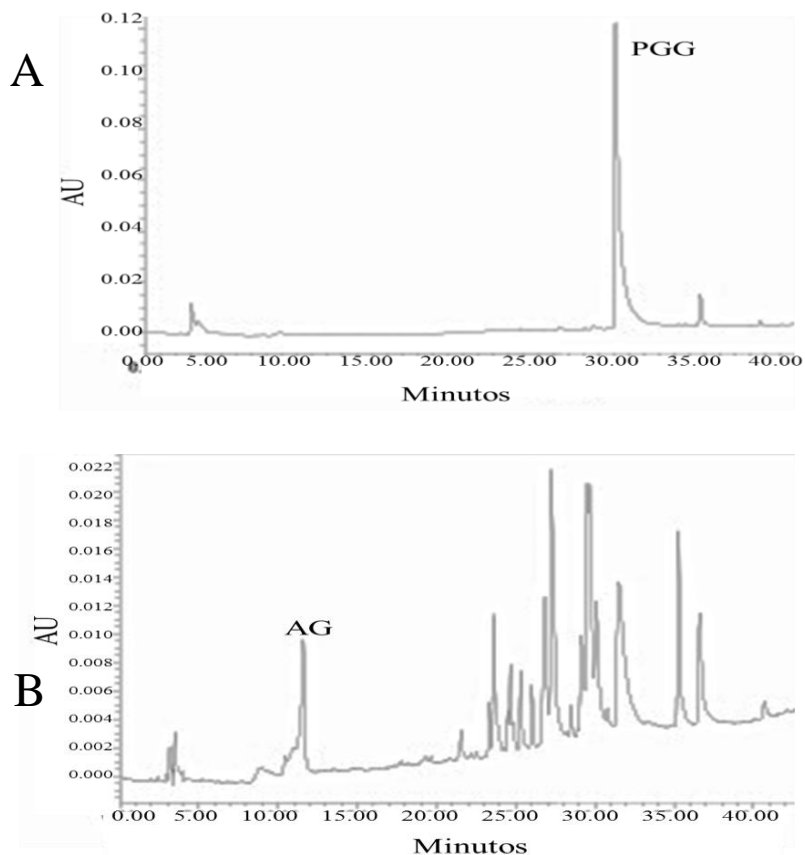


Figura 10. Hidrólisis de penta-galoil-glucosa con tanasa presente en superficie de mango a 0 min (A) y 120 min (B).

Fuente: Sirven M. 2016, modificado por el autor.

El tiempo en contacto de la enzima con el alcohol al 70% en el hisopo fue probado y se obtuvieron resultados positivos de actividad hasta luego de 1 h y 30 min de residencia. Se diseñó el prototipo de unas tiras de papel para una prueba rápida de rodanina. Las tiras de papel fueron sumergidas en reactivo rodanina al 0.667% metanol y se dejaron secar. Al utilizar estas tiras en una muestra que contiene ácido gálico, dejar 5 minutos y colocar unas gotas de base se pudo observar el cambio de color característico (Rosado). Este método sin embargo, podría utilizarse solo con el propósito de una identificación de compuesto. La cuantificación de concentración de ácido gálico vía tira de papel se dificulta ya que sería de manera visual y podría ser subjetiva dependiendo del individuo que la realice. Estas tiras de papel tuvieron una vida útil de hasta 28 días. Para determinar esto se mantuvieron en almacén tiras con reactivo y se fue realizando la prueba rápida durante ese tiempo, todas presentaron resultados positivos. Utilizar tiras de papel en lugar de soluciones líquidas supondría una ventaja de manejo, ya que éstas no corren riesgo de derramarse ni evaporarse.

Cuadro 4. Efecto de alcohol en la actividad de tanasa.

Alcohol 100%	Concentración de enzima (U/ml)	Color	Resultado	Absorbancia 520nm
Etanol	1	Naranja/rosado	Positivo	0.074 ^c
2-Propanol	1	Rosado	Positivo	0.094 ^b
Metanol	1	Naranja	Negativo	0.047 ^f
Control	1	Rosado	Positivo	0.146 ^a
Etanol	10 ⁻³	Naranja	Negativo	0.048 ^f
2-Propanol	10 ⁻³	Naranja	Negativo	0.054 ^e
Metanol	10 ⁻³	Naranja	Negativo	0.047 ^f
Control	10 ⁻³	Naranja	Negativo	0.023 ^d

Letras distintas (a-f) indican una diferencia significativa (P<0.005).

La prueba rápida rodanina es una propuesta para poder ser utilizada en laboratorios de investigación donde se necesitan candidatos para estudios sobre metabolismo de compuestos polifenólicos por ejemplo. La idea es utilizar la prueba de rodanina en muestras de orina de los individuos para poder identificar metabolitos provenientes de la absorción y síntesis de ácido gálico, el cual se encuentra en distintas frutas y té (Karamac *et al.* 2006). La presencia de estos metabolitos se podría correlacionar luego con un buen consumo de polifenoles en la dieta. La limitante con esta propuesta es que los compuestos resultantes del metabolismo generalmente son sulfatados, metilados o glucoronidados como producto del paso por el hígado y para mejorar su absorción celular (Barnes *et al.* 2016). Por esta razón, se propone aplicar un tratamiento a las muestras de orina, para ya sea provocar hidrólisis ácida, una degradación por calor o una combinación de ambas, de manera que los grupos sulfatos y metilos se desprendan de la estructura de pirogalol y éste sea capaz de reaccionar con la rodanina y formar el color.

Se aplicaron varios tratamientos de calor en combinación con un ácido fuerte (5 N HCl) a las muestras de orina en busca de la hidrólisis de los metabolitos. Sin embargo, luego de los ensayos ninguno de los tratamientos tuvo resultados positivos para rodanina. Se recomiendan investigaciones futuras y a profundidad en esta posible aplicación de rodanina para el área de nutrición. Continuar con la búsqueda de la combinación de un ambiente ácido, calor y tiempo óptimo podría ser la clave para romper los enlaces presentes en los metabolitos de ácido gálico. Por otra parte, se podría identificar enzimas con actividad metilasa y sulfatasa capaces de actuar sobre estos metabolitos. Finalmente, para monitorear de manera más eficaz el efecto de estos tratamientos en los metabolitos se recomienda hacer un seguimiento con tecnología más sofisticada como LC-MS.

4. CONCLUSIONES

- El ensayo rodanina fue específico para ácido gálico y pirogalol con un rango de detección entre 1 y 100 mg/L de ácido gálico.
- La hidrólisis de PGG fue más rápida que la de MGG, la cual a su vez generó galotaninos intermedios de menor peso molecular.
- Cuantificar exactamente la concentración de ácido gálico mediante el ensayo rodanina está limitado por la generación de absorbancia de otros compuestos en solución.
- El ensayo rodanina fue posible aplicarlo en ensayos para la identificación de actividad enzimática de tanasa en superficie de mangos pero no fue posible su uso para la identificación ni cuantificación de metabolitos de orina.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso del método rodanina en extracto de mango hidrolizado con tanasa.
- Aumentar la concentración de tanasa a utilizar o el tiempo de reacción para lograr completar la hidrólisis de PGG.
- Evaluar como las diferentes concentraciones de PGG y otros compuestos menores a diferentes tiempos de hidrólisis van afectando el resultado obtenido mediante ensayo rodanina.
- Analizar los 0, 1, 2, 3, y 5 minutos de hidrólisis de MGG haciendo uso de tanasa con el método HPLC.
- Evaluar la presencia de ácido gálico libre y componentes pro ácido gálico en alimentos haciendo uso de tanasa y el ensayo rodanina, con la intención de clasificarlos como benéficos para la salud.
- Usar metil galato en lugar de ácido tánico para determinar actividad enzimática de tanin acil hidrolasa mediante ensayo rodanina.
- Hacer un estudio de la hidrólisis de los metabolitos de ácido gálico en orina para liberar el pirogalol y hacerlos rodanina positivo.

6. LITERATURA CITADA

Aguilar C, Christopher A, Viniegra-González G, Favela E. 1999. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. *Braz Arch of Bio and Tech*, 42(3), 355-362. Doi:10.1590/S1516-89131999000300014

Aguilar C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, L. A., 2007. Microbial tannases: Advances and perspectives. *Appl Microb and Biot*, 76(1), 47–59. Doi:10.1007/s00253-007-1000-2

Albertse EH. 2002. Cloning, expression and characterization of tannase from *Aspergillus* species. Magister Thesis: Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Microbiology and Biochemistry. University of the Free State Bloemfontein. South Africa

Allen D, Cooksey C, Tsai B. 2010. Spectrophotometry (on line). Cited: Sept 7 2016. <http://www.nist.gov/pml/div685/grp03/spectrophotometry.cfm>

Álvarez M. 2011. Taninos y Flavonoides. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito, Ecuador. 55-61p.

Anjaneyulu V, Babu IS, Connolly JD. 1994. 29-Hydroxymangiferonic acid from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* 35:1301-1303. Doi:10.1016/S0031-9422(00)94842-8.

Arapitsas, P. 2012. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chem* 135 (3): 1708–1717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>

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.*, 95: 2337–2344. doi:10.1002/jsfa.6955

Barnes R, Krenek K, Meibohm B, Mertens-Talcott S, Talcott S. 2016. Urinary metabolites from mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) galloyl derivatives and in vitro hydrolysis of gallotannins in physiological conditions. *Mol. Nutri. Food Res.* 2016, 60, 542-550. DOI: 10.1002/mnfr.201500706

Belmares R, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Ramírez-Coronel A, Aguilar CN. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37 (8): 857 – 864. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.002>

- Berardini N, Carle R, Schieber A. 2004. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by HPLC-ESI-MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; 18: 2208-2216p. doi: 10.1002/rcm.1611
- Beyaz A, Fan W, Carr PW, Schellinger AP. 2014. Instrument Parameters Controlling Retention Precision in Gradient Elution Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. of chromatography A.* 2014;1371:90-105. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.085.
- Bowe CL, Mokhtarzadeh L, Venkatesan P, 1997. Design of compounds that increase the absorption of polar molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(22):12218-12223. PMC23755
- Chang FS, Chen PC, Chen RC, Lu FM, Cheng TJ. 2006. Real-time assay of immobilized tannase with a stopped-flow conductometric device. *Bioelectrochemistry* 69:113–116. doi: 10.1016/j.bioelechem.2005.12.004
- De Mesquita ML, Leão WF, Ferreira MRA, de Paula JE, Espindola LS, Soares LAL. 2015. Reversed-phase-liquid chromatography method for separation and quantification of gallic acid from hydroalcoholic extracts of *Qualea grandiflora* and *Qualea parviflora*. *Pharmacognosy Magazine.* 2015;11:316-321. doi:10.4103/0973-1296.166062.
- Díaz NA, Ruiz JAB, Reyes EF, Cejudo AG, Novo JJ, Peinado JP, Meléndez-Valdés FT, Fiñana IT. 2005. *Prácticas generales de bioquímica y biología molecular.* 6ta ed. Córdoba, España. Universidad de Córdoba.
- Enemour SC, Odibo FJC. 2009. Culture conditions for the production of a tannase of *Aspergillus tamarii* IMI388810 (B). (Citado 2016 Ago 15). *Afr. J. of Biotech.* Vol 8(11) 2554-2557p. <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60770/48993>
- FAOSTAT 2014. *FAO statistical Databases Agriculture* (en línea). Disponible en <http://faostat.fao.org> . Visitada el 27 de mayo de 2015.
- Friedman M, Jurgens H. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48 (6), 2101-2110p. DOI: 10.1021/jf990489j
- Inoue K, Hagerman A. 1988. Determination of gallotannin with rhodanine. *Anal Biochem.* 169, 363-369. doi:10.1016/0003-2697(88)90296-5
- Karamac M, Kosinska A, Pegg R. 2006. Content of gallic acid in selected plant extracts. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* Vol. 15/56, No 1, 55-58 p.
- Kasieczka-Burnecka M, Kuc K, Kalinowska H, Knap M, Turkiewicz M. 2007. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an antarctic strain *Verticillium* sp. P9. *Appl Microb and Biot* 77 (1): 77 – 89p. DOI: 10.1007/s00253-007-1124-4.

- Krenek K., R. Barnes, S. Talcott. 2014. Phytochemical composition and effects of commercial enzymes on the hydrolysis of gallic acid glycosides in mango pulp. *J. Agri. Food Chem.* 62 (39), 9515-9521p. doi: dx.doi.org/10.1021/jf5031554
- Kumar R, Sharma J, Singh R. 2006. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. *Microbiol Res.* Doi: 10.1016/J.micres.2006.06.012
- Lekha P, Lonsane B. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44: 215-260p. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311108>
- Mandal S, Ghosh K. 2013. Isolation of tannase-producing microbiota from the gastrointestinal tracts of some freshwater fish. *J. Appl. Ichthyol.* 29: 145–153. doi:10.1111/j.1439-0426.2012.02054.x
- Masibo M, He Q. 2008. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Compr. Rev. in Food Sci and Food Saf.* 7: 309–319. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00047.x
- Muhammad I., P. Nagendra, I. Amin, A. Azrina, H. Azizah. 2010. Physiochemical composition and antioxidant activities of underutilized *Mangifera pajang* fruit. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 9(28):4392-4397
- Olivas F., A. Wall, G. Gonzales, J. Lopez, E. Álvarez, L. de la Rosa, A. Ramos 2015. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria* Vol. 31 (1) 55-66 p.
- Muñoz A., F. Ramos-Escudero, C. Alvarado-Ortiz, B. Castañeda. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química de Perú.* V.73 n.3.
- Ozkan S, Unal HI, Yilmaz E, Suludere Z. 2015. Electrokinetic and antibacterial properties of needle like-TiO₂/polyrhodanine core/shell hybrid nanostructures. *J. Appl. Polym. Sci.*, 132, 41554, doi: 10.1002/app.41554
- Rana N, Bhat T (2005) Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *J Gen Appl Microbiol* 51:203–212. Doi: 10.2323/jgam.51.203
- Rodríguez H., B. de las Rivdas, C. Gómez-Cordovés, R. Muñoz. 2008. Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, Vol 107, I2 664-670 p.
- Sellés AJ, Villa DG, Rastrelli L. 2015. Mango polyphenols and its protective effects on diseases associated to oxidative stress. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16(3); 272-80. (Citado 2016 Ago 13). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658517>

Shahrzard S., I. Bitsch 1998. Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urina by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Scie Appl. Jan 23;705(1):87-95.

Shahrzad S., K. Aoyagi, A. Winter, A. Koyama, I. Bitsch. 2001. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. J. Nutrition Vol. 131 No. 4 1207-1210p.

Sharma S. 1998. Biochemical Studies on Microbial Biotransformation of Polyphenols, M.Sc. thesis, Himachal Pradesh Agricultural University, Palampur, H.P., India.

Sharma S., T. Bhat, R. Dawra. 2000. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. Analytical Biochemistry, 279, 85-89.

Snyder L., J. Kirkland, J. Glajch. 1997. Practical HPLC method development. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.

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.

Tharanathan R. 2006. Mango (*Mangifera indica*), “the king of fruits” – an overview. Food Rev. Int. 22, 95-123.

Torres YX. 2011. Actividad biológica y aplicaciones terapéuticas en cáncer del compuesto natural PGG [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana-Bogotá. 32p.

World Health Organization. 2013. World health report 2013: Research for universal health coverage. Available on: <http://www.who.int/whr/en/>. Visited May 30th 2016.

Wu M, Wang Q, McKinstry WJ, Ren B. 2015. Characterization of a tannin acyl hydrolase from *Streptomyces sviveus* with substrate preference for digalloyl ester bonds. Appl Microbiol Biot, 99(6), 2663-2672. Doi: 10.1007/s00253-014-6085-9

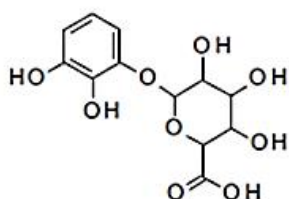
Xia G, Lin C, Liu S. 2016. Tannase-mediated biotransformation assisted separation and purification of theaflavin and epigallocatechin by high speed counter current chromatography and preparative high performance liquid chromatography: a comparative study. Microsc. Res. Tech.. doi:10.1002/jemt.22715.

Xiao-Wei Y., L. Yong-Quan 2006. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. J Mol Catalysis B:Enzymatic. Vol. 40, Issues 1-2, 44-50p.

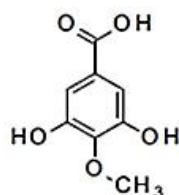
Zamora F., I. Hermosin, E. Garcia, N. Castillo. 2014. Factores que condicionan la astringencia y el sabor amargo de los vinos tintos; influencia de la madurez de la uva y de las técnicas de crianza. IICAM. AGL2011-29708-C02-02.

7. ANEXOS

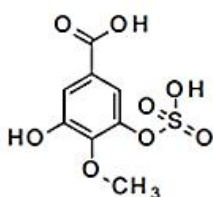
Anexo 1. Estructura química tentativa para los siete metabolitos urinarios derivados de ácido gálico (Barnes et al. 2016).



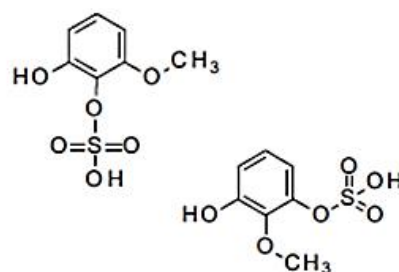
M1. pyrogallol-1-O-glucoronide



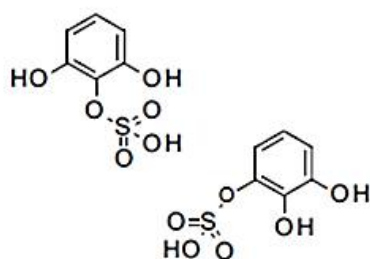
M2. 4-O-methyl-gallic acid



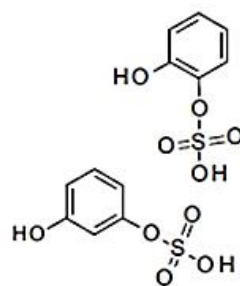
M3. 4-O-methylgallic acid-3-O-sulfate



M4, M7. O-methylpyrogallol-O-sulfate

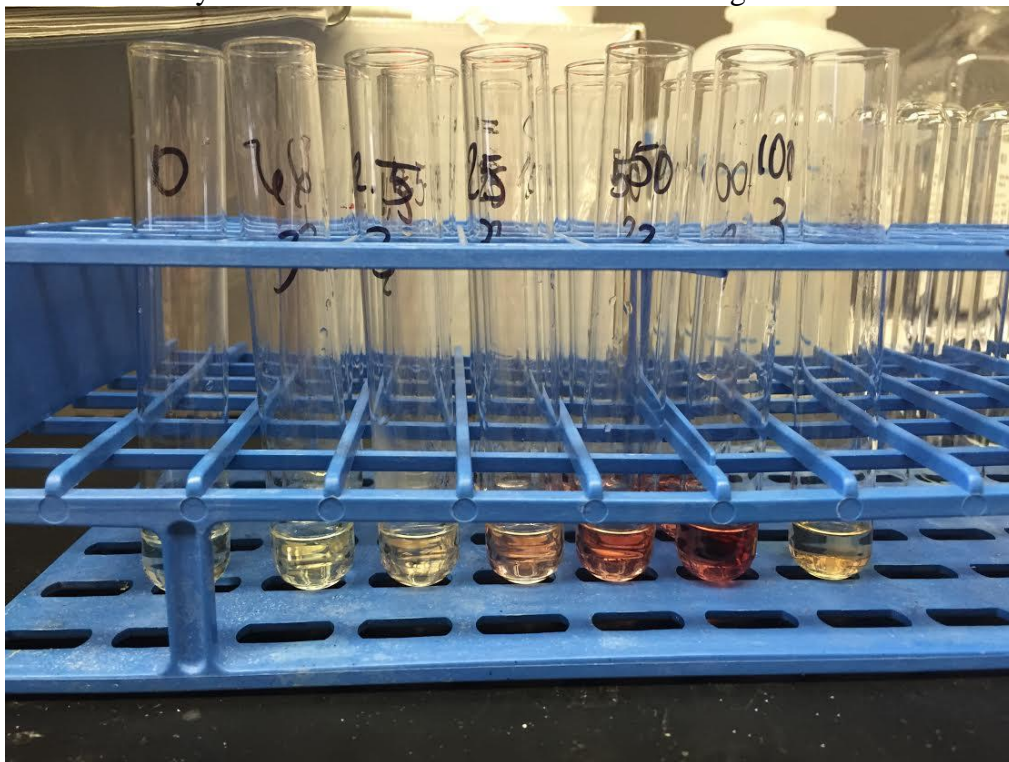


M5. pyrogallol-O-sulfate

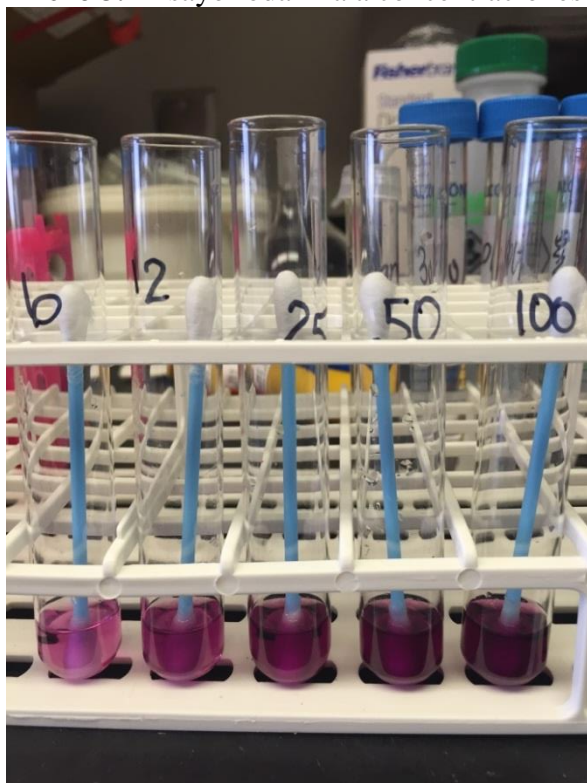


M6. deoxypyrogallol-O-sulfate

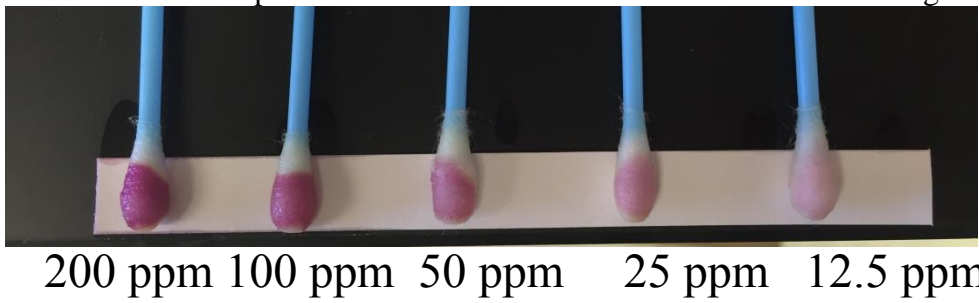
Anexo 2. Ensayo rodanina a concentración de 0 a 100 mg/L de ácido tánico.



Anexo 3. Ensayo rodanina a concentraciones de 6 a 100 mg/L de ácido gálico.



Anexo 4. Prueba rápida rodanina a diferentes concentraciones de ácido gálico.



Anexo 5. Tiras de prueba rápida de rodanina a diferentes concentraciones de ácido gálico.

