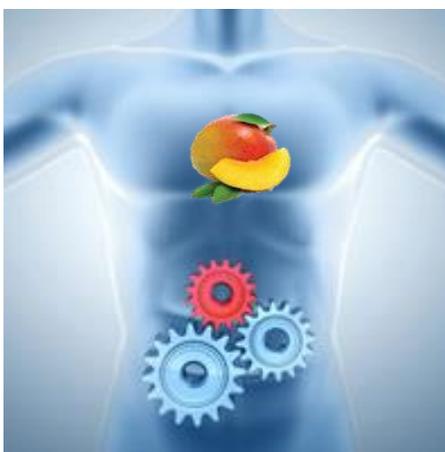


Objetivo I: In Vitro metabolismo de polifenoles del Mango y sus actividades anti-inflamatorias



Dr. Susanne Talcott (smtalcott@tamu.edu) and
Dr. Stephen Talcott (stalcott@tamu.edu)
Texas A&M University, Department of Nutrition and Food Science
1500 Research Parkway A
Centeq Research Plaza, Room 220F
College Station, TX 77843-2253

220K Centeq A
1500 Research Parkway
Teléfono: 979-458-1819
MS 2254
College Station, TX 77843-2253

Email: smtalcott@tamu.edu

Fax: 979-862-7944
Web: <http://nfsc.tamu.edu>

Resumen ejecutivo

Objetivos: Los objetivos de esta investigación fueron evaluar **a)** la estabilidad de un aislado de galotanina de mango para predecir la hidrólisis que podría ocurrir in vitro, lo que proporcionará una nueva visión del comportamiento fisiológico de la galotanina, **b)** investigar la bioaccesibilidad de los derivados de galloyl de mango in vitro y en un estudio de absorción porcina, y **c)** evaluar sus actividades anti-inflamatorias en cultivo celular.

En resumen, tanto el ácido gálico como la monogaloilglucosa son bioaccesibles a partir de diferentes preparaciones de frutas de mango, capaces de ser absorbidas en el intestino delgado y capaces de producir cantidades similares de los metabolitos de fase II, ácido 4-O-metilgálico y 4-O-metilgálico Ácido - 3 - O - sulfato. Gallotaninos en estos modelos de digestión in vitro se encontraron para actuar como depósitos de ácido gálico que tienen el potencial para liberar ácido gálico libre durante la digestión que puede llegar a ser eventualmente ácido gálico absorbible.

Los polifenoles de mango se metabolizan principalmente en pirogalol, que se transforma en sulfato de pirogalol en el cuerpo humano. Este derivado de los polifenoles del mango es más citotóxico que sus compuestos paternos y el extracto del mango. Además, ejerce efectos anti-inflamatorios significativos en las células humanas. En general, estos datos muestran que los metabolitos generados a partir de gallotaninos de mango tienen potentes propiedades citotóxicas y antiinflamatorias. Los mangos tienen los niveles más altos en gallotaninas entre las frutas y los datos muestran que cantidades significativas de pirogalol y ácido gálico son generados en los intestinos por las bacterias intestinales (por ejemplo, *Lactobacillus plantarum*) donde son absorbibles en el torrente sanguíneo.

Por consiguiente, además de ejercer actividades antiinflamatorias locales, ejercen actividades sistémicas, efectos anti-inflamatorios generales que son relevantes para las enfermedades cardiovasculares, artritis y otras enfermedades crónicas.

Los mangos tienen una posición muy única entre las frutas debido a los potentes metabolitos que pueden ser generados. Es necesario realizar estudios detallados de eficacia clínica humana para confirmar el potencial antiinflamatorio en seres humanos. Esto promovería el consumo de mangos como lo hizo con otros productos.

La investigación realizada resultó en las siguientes comunicaciones de investigación:

Resúmenes:

RC Barnes, H Kim, NE Deutz, SU Mertens-Talcott, ST Talcott. In Vitro and In Vivo Absorption of Mango Galloyl Derivatives. IFT 2016, Chicago

Manuscritos/publicaciones arbitradas:

Publicadas

Pyrogallol, an absorbable microbial gallotannins-metabolite and mango polyphenols (*Mangifera Indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation in

vitro. Nemeč MJ, Kim H, Marcianč AB, Barnes RC, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Food Funct. 2016 Sep 14;7(9):3825-33. doi: 10.1039/c6fo00636a. PMID: 27491891

Sumitidas

RC Barnes, H Kim, NE Deutz, SU Mertens-Talcott, ST Talcott. In Vitro Bioaccessibility and In Vivo Absorption of Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo Galloyl Derivatives, submitted to Food and Function

En preparacion

H Kim, Y Minamoto, ME Markel, M Zhu, K Hull, JS Suchodolski, ST Talcott, SU Mertens-Talcott. Anti-inflammatory properties of mango polyphenolic derivatives produced by fecal microbiota in DSS-induced colitis in rats.

Introducción

Nuestro objetivo final es demostrar las propiedades químicas y bioquímicas de los mangos que permitirán comercializar mejor el mango fresco. Esta investigación también sentará bases vitales para la obtención de reclamaciones legales y de marketing relacionadas con la composición y beneficios para la salud de los mangos. Reconocemos que estas fundaciones son fundamentales para construir un sólido caso de trabajo para estos objetivos finales.

Antecedentes: El mango es una rica fuente de polifenoles que han demostrado in vitro que ejercen propiedades anti-inflamatorias y anti-cancerígenas. La popularidad mundial de esta fruta sugiere que es capaz de afectar la salud de muchos. Mientras que los cultivos celulares in vitro revelan mecanismos para propiedades promotoras de la salud, a menudo no toma en consideración el efecto de la digestión y el metabolismo en los fitoquímicos del mango. Por esta razón, es crucial investigar el metabolismo de los polifenoles del mango y las propiedades antiinflamatorias de sus derivados bioactivos en un sistema digestivo humano.

Metabolismo de los polifenoles: Si bien se han atribuido varios beneficios para la salud a los polifenoles, es posible que estos beneficios sean limitados debido a la baja biodisponibilidad (1), potencialmente resultante de la disolución incompleta de los alimentos en diversas etapas de la digestión. La biodisponibilidad de un polifenol es el resultado de su capacidad para ser transportada a través de un enterocito mientras que su bioaccesibilidad se define como la cantidad de compuesto en solución que está disponible para la absorción. Las diferencias en la biodisponibilidad entre polifenoles son el resultado de un complejo equilibrio entre el tamaño de un compuesto, la polaridad, la presencia de glucósidos o acilación, y la interacción con la matriz alimentaria (2). La biodisponibilidad, el metabolismo y las posibles propiedades promotoras de la salud tanto del ácido gálico como de la pentagaloyl glucosa han sido previamente estudiados (3). Sin embargo, se sabe poco sobre el destino metabólico de la monogaloylglucosa, que puede ser responsable de más del 50% del contenido de polifenoles no taninos en algunas variedades de mango (4).

Objetivos: Los objetivos de esta investigación fueron evaluar a) la estabilidad de un aislado de galotanina de mango para predecir la hidrólisis que podría ocurrir in vitro, lo que proporcionará una nueva visión del comportamiento fisiológico de la galotanina, b) investigar la bioaccesibilidad de los derivados de galloyl de mango in vitro y en un estudio de absorción porcina, y c) evaluar sus actividades anti-inflamatorias en cultivo celular.

Hipótesis: Se planteó la hipótesis de que las diferencias en la absorción, el metabolismo y la excreción de ácido gálico, monogaloyl glucosa y glicosidos de galloyl más grandes podrían afectar potencialmente las propiedades promotoras de la salud de los mangos.

Importancia: En la actualidad, los mecanismos moleculares de los beneficios para la salud de los polifenoles de mango no están bien investigados. Con el fin de evaluar el

papel de los polifenoles de mango en los beneficios para la salud, estamos investigando qué polifenoles en el mango son los más propensos a ser absorbidos. Si se comprenden claramente los mecanismos de salud de los polifenoles del mango, esto allanaría el camino hacia la justificación de las afirmaciones de salud sobre el consumo de mango.

Enfoque del estudio

Mangos: Los mangos frescos (cv. Ataulfo y Keitt) fueron obtenidos y enviados refrigerados al Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Universidad Texas A&M. Los mangos se maduraron en condiciones ambientales, y cuando se alcanzó la madurez uniforme, la fruta se peló y se extrajo la semilla manualmente. La pulpa se cortó en cubos, se cerró herméticamente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Bioaccesibilidad in vitro: Las condiciones de digestión in vitro para evaluar la bioaccesibilidad del polifenol fueron similares a los modelos descritos anteriormente con algunas modificaciones (5). Por triplicado, se colocaron 10 g de pulpa de mango homogeneizada o 10 g de cubos de mango de $0,65\text{ mm}^3$ en tubos Falcon de 50 ml. Se añadió agua desionizada (4 ml) junto con 12 ml de solución comercial de digestión gástrica que contenía pepsina para alcanzar un pH de $2,0 \pm 0,1$, simulando condiciones de estómago. Las muestras se mantuvieron en un baño de agua de agitación ThermoFisher SWB25 (Hampton, NH) a 37°C . A 0, 1 y 2 h se retiraron alícuotas, se centrifugaron durante 2 min a $4.000 \times g$ y se obtuvo 1 ml de sobrenadante para el análisis. Después de la digestión gástrica, se añadieron Na_2CO_3 0,2 M (16 ml) junto con 0,5 ml de una mezcla de enzimas digestivas (2,4 mg / ml de bilis, 0,4 mg / ml de pancreatina y 0,2 mg / ml de lipasa) para elevar el pH a $7,1 \pm 0,1$ y simular las condiciones del intestino delgado y colon. Las muestras se lavaron con nitrógeno para crear un entorno anaeróbico y se devolvieron al baño de agua. A las alícuotas de 2, 4, 6 y 8 h se centrifugaron de nuevo y se recogieron 1 ml de sobrenadante. Cada alícuota se acidificó inmediatamente con 0,1 ml de ácido fórmico al 88%, se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 5 minutos y se filtró a través de un filtro de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ para análisis HPLC-MS. La fracción bioaccesible se calculó mediante la relación de la cantidad (mg) de polifenol en el sobrenadante a la cantidad inicial (mg) en 10 g de pulpa de mango. Como control, también se preparó un extracto de mango a partir de 1 kg de mango, utilizando los procedimientos de extracción se describen a continuación. Este extracto de mango y 10 mg / l de soluciones estándar de ácido gálico y monogalactosido glucosídico se sometieron a los mismos procedimientos de digestión in vitro que el cubo homogéneo y la pulpa y representaron soluciones que contenían 100% de polifenoles bioaccesibles. Después de la digestión in vitro de 10 h, se extrajeron adicionalmente y se cuantificaron la cantidad (mg) de derivados de galloyl insolubles que quedaban en la pulpa de mango homogeneizada digerida y en mango en cubos. Los derivados de galloyl se aislaron por centrifugación de los resúmenes restantes durante 5 min a 4000 seguido de filtración al vacío usando papel de filtro Whatman # 4 durante 5 min. El material insoluble se extrajo como se describió a continuación evaporaron los disolventes, se reconstituyeron en agua acidificada acidificada y se filtraron a través de una membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ para análisis HPLC-MS.

Digestión de Gallotanninos In Vitro: Se preparó un aislamiento de gallotanina de Ataulfo debido a la alta concentración de gallotanninos de Ataulfo. Se adsorbió una porción de 150 ml del extracto de Ataulfo en un cartucho C18 de sep-pak de 6 cc y se lavó posteriormente con una solución al 20% de metanol para eluir polifenoles sin galotanina. Los compuestos que quedaban en el cartucho se eluyeron con metanol al 100% y se evaporaron a sequedad bajo vacío a 45 °C. El aislado de gallotanina resultante se reconstituyó en 15 ml de agua acidificada con HCl al 0,01% y el contenido fenólico total se midió en equivalentes de ácido gálico. Para evaluar la estabilidad de los gallotanninos en condiciones similares al intestino delgado, el aislamiento de galotanina se diluyó hasta una concentración final de 280 mg / l de GAE en Hank's Balance Salt Solution (HBSS), Hyclone® Thermo-Fisher y el pH se ajustó a 7,4 con NaOH 1,0 M. Se tomó inmediatamente una muestra de control (t = 0) y se reajustó el pH a 3,0 ± 0,2 con HCl 1,0 M. La estabilidad del aislamiento de gallotanina se evaluó después de la incubación a 37°C y se muestreó a 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, horas, por triplicado. Después de cada muestreo, el pH se ajustó a 3,0 ± 0,2 tal como se ha descrito y las alícuotas se centrifugaron a 10.000 x g para separar las partículas y se analizaron con LC - MS.

Absorción in vitro de ácido gálico y glucosa monogaloil: El ácido gálico, glucosa monogaloil y pirogalol se evaluaron en un modelo de transporte trans-epitelial monocapa Caco-2. Los procedimientos del modelo de transporte Caco-2 se basaron en procedimientos como los descritos anteriormente. Las células Caco-2 se adquirieron de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en medio que contenía suero bovino fetal al 84%, penicilina al 4%, glutamina al 4%, piruvato sódico al 4% y aminoácidos al 4%. Se sembraron células entre 10 - 30 pasos sobre placas de inserto de cultivo de células de poliéster transparentes de 2 mm (Transwell, Corning Costar Corp., Cambridge, MA) a 1,0 x 10⁵ células por inserto con 0,5 ml de medio en el lado apical y 1,5 ml del medio en el lado basal. Las monocapas crecieron durante 21 días y la confluencia se midió por resistencia con un ohmímetro de EndOhm Volt equipado con un electrodo STX-2 (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL); monocapas con una resistencia de (> 450 Ω cm²) se utilizaron para ex $f = \frac{AUC_{\text{Oral}} * Dose_{\text{iv}}}{AUC_{\text{iv}} * Dose_{\text{oral}}}$ con f como biodisponibilidad absoluta y AUC como área bajo la curva. Los resultados se calcularon a partir de dos extracciones independientes de plasma porcino y se informó como la media ± error estándar de la media.

Análisis de LC-MS: Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa iónica LCT Deca XP Max MSn de Thermo Finnigan equipado con una fuente de ESI. Las separaciones se realizaron en fase inversa utilizando un Thermo Finnigan Surveyor HPLC acoplado a un detector Surveyor PDA y las separaciones de gradiente se realizaron usando una columna Phenomenex Kinetex™ (Bannockburn, Ill) C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 μm) a temperatura ambiente. Las inyecciones se hicieron en la columna mediante el uso de un bucle de muestra de 50 μL. Para la separación de los metabolitos de orina, la fase móvil A era ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B era ácido fórmico al 0,1% en metanol a 0,4 ml / min. Se llevó a cabo un gradiente de 0% de fase B durante 2 min y se cambió a 10% de fase B en 4 min, 10 a 15% de fase B en 8,5 min, 15% a 27% de fase B en 11 min, 27% a 90% de fase B en 15 minutos, el 90% se mantuvo a 0,5 min antes de volver a las condiciones iniciales. Para la

separación de los metabolitos plasmáticos, la fase móvil A era ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B era ácido fórmico al 0,1% en metanol a 0,45 ml/min. Se llevó a cabo un gradiente de 0% de fase B durante 2 min y se cambió a 10% de fase B en 4 min, se mantuvo 10% de fase B a 10 min, 10 a 40% de fase B en 25 min y 40% a 65% de fase B en 35 min, 65% a 85% de Fase B en 41 min, 85% se mantuvo a 49 min antes de volver a las condiciones iniciales. La interfaz de electrospray funcionó en modo de ionización negativa. Las temperaturas de origen y capilar se fijaron a 325 °C, el voltaje de la fuente fue de 4,0 kV, el voltaje capilar se estableció a -47 V, y la energía de colisión para el análisis de MS / MS se estableció a 35 eV. El instrumento funcionaba con gas de envoltura y caudales de gas auxiliar (N₂) fijados en 10 unidades/min y 5 unidades/min, respectivamente. El instrumento se sintonizó para el ácido 4-O-metilgálico y los metabolitos se cuantificaron usando cromatogramas de iones extraídos de sus compuestos parentales respectivos como patrones.

Actividades citotóxicas de los polifenoles: Para asegurarse de que los extractos usados no fueran citotóxicos a las células durante la realización de estudios de inflamación y de absorción, las células HT-29 se incubaron con polifenoles de mango y sus metabolitos (1-20 mg/L del total Equivalentes polifenólicos) y sus efectos sobre el crecimiento celular se determinaron después de 48 horas usando un Kit de Viabilidad Celular de Resazurina.

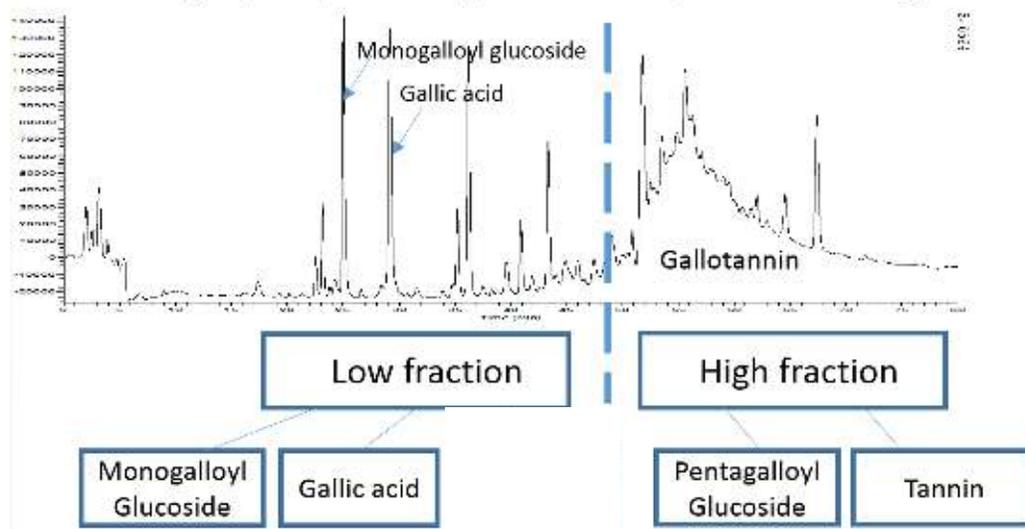
Los marcadores de inflamación clave se seleccionaron mediante Real-Time PCR (Biomarcadores incluyen: IL-1 β , IL-6 y TNF α). Los colonocitos humanos no cancerígenos de CCd-18Co se cultivaron y se prepararon para experimentos como se describió previamente (7). Se indujo inflamación con LPS y se trataron células con polifenoles durante 4 h.

Análisis estadístico.

La digestión in vitro y los experimentos de Caco-2 se evaluaron por triplicado y en recipientes de reacción independientes. Para el modelo porcino, dos extracciones de plasma independientes se realizaron antes de LC-MS análisis. Las diferencias estadísticas se compararon utilizando unpaired t-test en el software JMP. Todos los valores se reportan como la media \pm error estándar de la media.

Resultados

Chromatographic profile of phenolic compounds in Mango



Los informes anteriores han documentado las altas concentraciones de fenolicos galactados y gallotaninas en la pulpa del cultivar Ataulfo en comparación con otras variedades de mango (8). Se caracterizaron ocho derivados de galloyl en la pulpa de Ataulfo utilizada en estos estudios, que incluía ácido gálico, monogaloil glucosa esterificada y seis taninos que varían en grado de conjugación galoyl de 5 a 10 grupos galoyl. Las caracterizaciones se basaron en los espectros de UV y de masa en comparación con los valores publicados para estos compuestos (9). Monogaloil glucosa estaba presente en la concentración más alta a $229 \pm 9,3$ mg/kg, frente a $9,09 \pm 0,17$ mg/kg para el ácido gálico libre. En forma acumulativa, los seis gallotaninos totalizaron $409 \pm 45,4$ mg/kg y variaron individualmente en la concentración de $6,56 \pm 1,20$ mg/kg para la glucosa pentagalóica a $117 \pm 9,34$ mg/kg para la glucosa noagalosa cuando se cuantificaron en equivalentes de glucosa pentagaloyl.

Se comparó la bioaccesibilidad de los polifenoles de la pulpa de mango homogeneizada y del mango en cubos con un extracto de mango 100% bioaccesible que sirvió como control en condiciones de digestión in vitro (Figura 1). La glucosa monogalosa fue fácilmente soluble en la solución gástrica a 0 h tanto en la pulpa de mango homogeneizada como en el mango en cubos, con una bioaccesibilidad inicial de $75,1 \pm 6,25\%$ y $61,0 \pm 5,80\%$ respectivamente, y no hubo cambios significativos ($p < 0,05$) en las primeras 2 horas en condiciones gástricas. A las 4 h, 2 h después de la transición del pH desde el estómago a los intestinos, la bioaccesibilidad de monogaloil glucosa aumentó significativamente para mango homogeneizado y cubicado a $98,0 \pm 4,58\%$ y $85,0 \pm 10,58\%$, respectivamente, mientras que la concentración de monogaloilglucosa en el extracto de mango disminuyó a $81,2 \pm 2,49\%$ de su concentración inicial. Esto indica que la estructura del mesocarpo puede ser crítica para estabilizar la monogaloilglucosa tanto en condiciones digestivas ácidas como alcalinas.

Después de 10 h de digestión, se observó una pérdida significativa de monogaloil glucosa y las concentraciones disminuyeron a $61,6 \pm 7,98\%$, $57,9 \pm 5,23\%$ y $52,1 \pm 8,41\%$ para el extracto de mango, pulpa de mango homogeneizada y mango en cubos, respectivamente. Del mismo modo, cuando un estándar de monogaloil glucosa se mantuvo en condiciones de digestión in vitro sólo $60,3 \pm 2,41\%$ se mantuvo después de 10 h (Figura 2). Los polifenoles son propensos a la auto-oxidación en condiciones de pH duodenal a colónico, y esto puede conducir a una formación progresiva de compuestos oxidados y polimerizados en el intestino delgado y del intestino grueso (10). Los resultados sugieren que cuando la bioaccesibilidad del polifenol aumenta durante la digestión, como se observó con los homogeneizados y en la pulpa de mango en cubos, su concentración puede disminuir rápidamente debido a la inestabilidad bajo condiciones de pH elevadas.

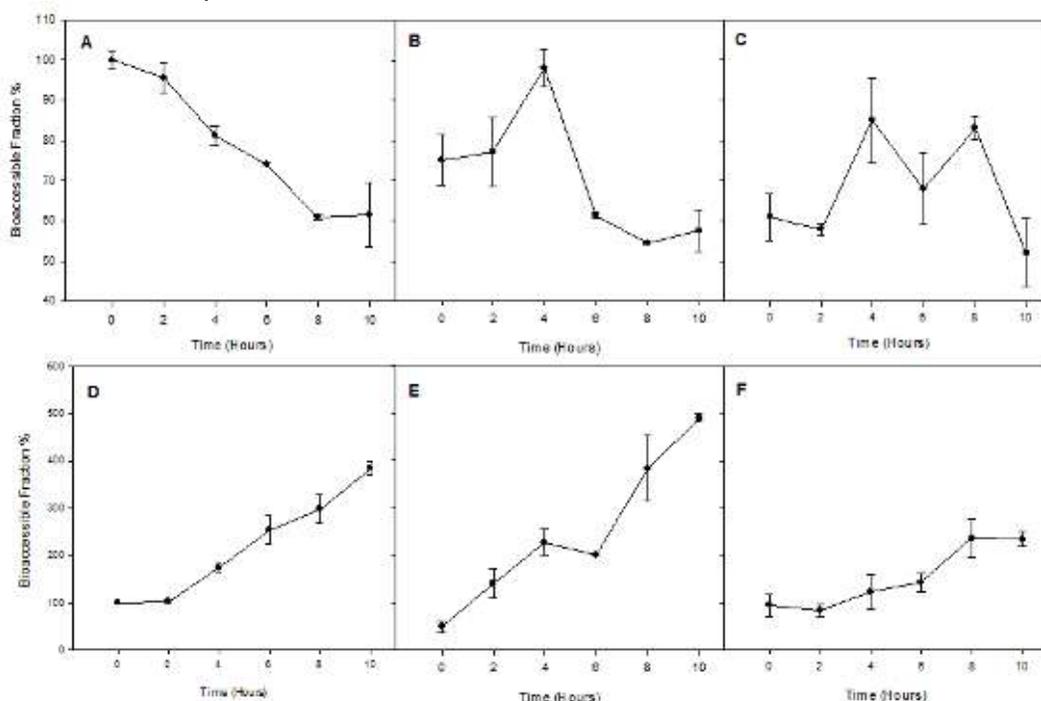


Figura 1. Bioaccesibilidad de monogaloil glucosa en (A) extracto de mango, (B) pulpa de mango homogeneizada, y (C) mango en cubos y ácido gálico libre en (D) extracto de mango, (E) pulpa de mango homogeneizada, y (F) mango en cubos bajo condiciones de digestión in vitro a 37°C, pH 2,0 para 2 h y pH 7,1 durante 8 h, con enzimas digestivas.

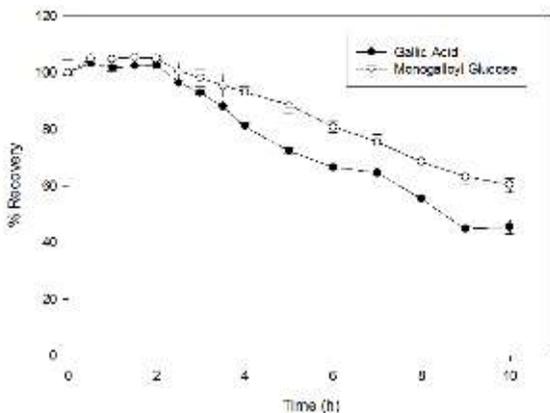


Figura 2. Estabilidad del ácido gálico y de la monogaloilglucosa después de la digestión in vitro a 37°C pH 2,0 durante 2 h y pH 7,1 durante 8 h, con enzimas digestivas.

En contraste con la monogaloilglucosa, se encontró que los galotaninos de mango tenían una bioaccesibilidad limitada tras la digestión in vitro sin cantidades cuantificables de galotaninas en la solución de digestión. Cuando se realizaron extracciones de disolventes post-digestión en las preparaciones de fruta, se encontró que $51,5 \pm 8,12\%$ y $88,5 \pm 1,03\%$ de la cantidad inicial de galotaninos permanecieron en la matriz de fruta para la pulpa de mango homogeneizada y mango en cubos, respectivamente (Figura 3). Por ingestión, los galotaninos unidos a la matriz alimenticia en el pericarpio de la fruta pueden llegar a ser bioaccesibles debido a la degradación microbiana de las pectinas y otros materiales de la pared celular (11). La liberación de galotaninas de mango en el colon podría conducir a beneficios potenciales para la salud; Principalmente a través de la hidrólisis enzimática para producir ácido gálico bioaccesible y pirogalol, principal metabolito microbiano (12).

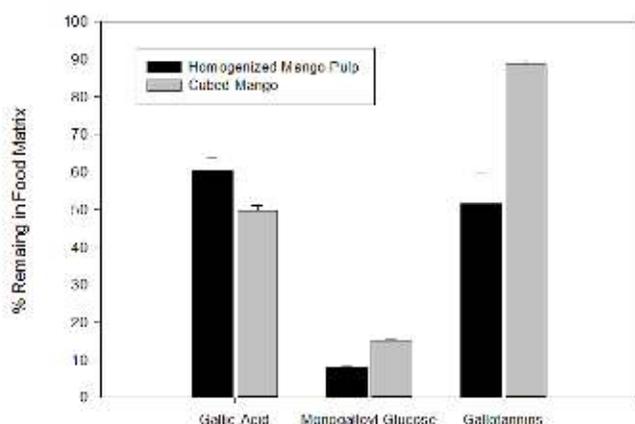


Figura 3. Ácido gálico, monogaloil glucosa y galotaninas unidos a matrices celulares de pulpa de mango homogeneizada y mango en cubos tras digestión in vitro a 37 °C pH 2,0 durante 2 h y pH 7,1 durante 8 h con enzimas digestivas.

El ácido gálico libre aumentó significativamente ($p < 0,05$) después de 10 h de la digestión in vitro en $384 \pm 14,9\%$, $490 \pm 9,68\%$ y $233 \pm 15,8\%$ para el extracto de mango, pulpa de mango homogeneizada y mango en cubos, respectivamente (Figura 1). El ácido gálico comúnmente experimenta una degradación extensa cuando se expone a condiciones de pH fisiológicas y cuando un estándar auténtico fue incubado en condiciones de digestión in vitro, la cantidad de ácido gálico disminuyó a $45,4 \pm 2,51\%$ de su concentración inicial durante 10 h (Figura 2). Esto indica que la concentración de ácido gálico determinada después de 10 h es el resultado de la generación simultánea de hidrólisis de galotanina y degradación de ácido gálico en condiciones de pH intestinal (13). En contraste, es poco probable que la monogaloilglucosa sea una fuente de ácido gálico hidrolizado como cuando Monogaloil glucosa se incubó solo en condiciones digestivas in vitro no se produjo ácido gálico libre. La digestión in vitro de extracto de mango y pulpa homogeneizada resultó en cantidades significativamente mayores de ácido gálico bioaccesible en conjunción con una mayor concentración de galotaninos que se liberaron en solución mientras que se produjo significativamente menos ácido gálico a partir de mango en cubos. Esto indica que la mayoría de los galotaninos en el mango en cubos puede ser capaz de alcanzar el colon y estar disponible para el metabolismo microbiano, resultando potencialmente

en una mayor producción de pirogalol. Se desconoce cómo estas diferencias pueden afectar la bioactividad, sin embargo pirogalol el principal metabolito de colon de ácido gálico se ha informado de tener propiedades anti-carcinógenas (14), y puede ser beneficioso para elegir una matriz de alimentos que retiene los galotaninos a través de digestión intestinal superior para apoyar su generación en el colon.

Digestión in vitro de los Galotaninos.

Se evaluó la distribución del peso molecular de los galotaninos después de la incubación en cultivo celular y en condiciones intestinales, pH 7,4 y 37°C, para determinar la extensión de la hidrólisis de galotanina y para estimar la cantidad subsiguiente de ácido gálico liberado que podría incluirse potencialmente en la porción disponible biológicamente de polifenoles del mango. Antes de la incubación, más del 63% del aislamiento de galotanina (Figura 4) estaba compuesto de compuestos con pesos moleculares correspondientes a 8GG, 9GG, 10GG, 11GG y 12GG, respectivamente.

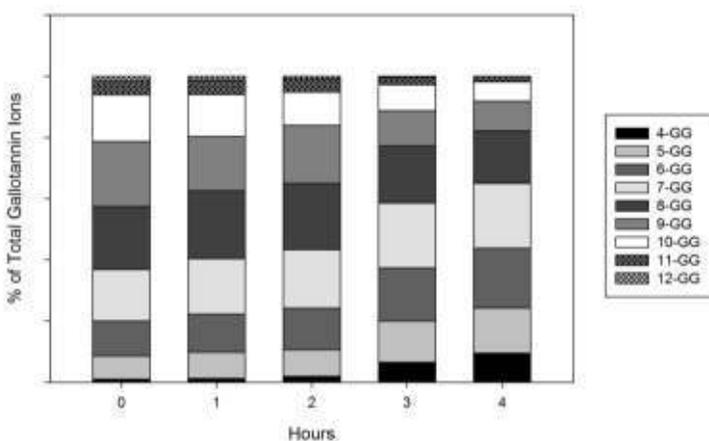


Figura 4. Hidrólisis de Galotaninos en condiciones de pH fisiológicas.

Durante un período de cuatro horas, el equilibrio cambió a un predominio de galotaninas con pesos moleculares correspondientes a 4GG, 5GG, 6GG y 7GG. El aumento de galotaninos de menor peso molecular se debió a la hidrólisis de moléculas de galotanina más grandes que generaron ácido gálico libre que puede absorberse o ser un sustrato para el microbioma. La degradación de los galotaninos utilizados en el presente estudio produjo 23 mg/L de ácido gálico libre potencialmente más biodisponible en cuatro horas.

In vivo e in vitro absorción de ácido gálico y glucosa monogaloil.

Por primera vez se evaluó el transporte de monogaloil glucosa en un modelo de monocapa Caco-2 y se comparó con el ácido gálico. Fisiológicamente, la absorción de polifenoles del intestino delgado se rige por la estereoquímica y la polaridad, y muchos polifenoles de mayor peso molecular o aquellos con grupos funcionales polares tienen menos probabilidades de ser absorbidos(15). El ácido gálico y la monogaloilglucosa se aplicaron por separado a la capa apical a 50 µg/ml y sus velocidades de transporte (apical a basolateral) fueron de $160 \pm 59,4$ µg/ml · h y $257 \pm 43,1$ µg/ml · h, respectivamente (Tabla 1). Después de 2 h de transporte, $0,98 \pm 0,14\%$ de monogaloil

glucosa se había transportado comparado con el $0,67 \pm 0,13\%$ para ácido gálico, una diferencia no significativa. Con velocidades de transporte similares es posible que la monogaloil glucosa se transporta a través del mismo mecanismo que el ácido gálico, sin embargo, dado el resto de glucosa hay potencial para las interacciones del transportador de glucosa (16).

La biodisponibilidad de ácido gálico y monogaloilglucosa se evaluó en un modelo porcino y se comparó cualitativamente con el transporte en la monocapa de células Caco-2. Mediante el uso de soluciones tamponadas de ácido gálico y monogaloilglucosa administradas por vía oral e intravenosa, se estimó la absorción mediante la monitorización de las concentraciones de ácido gálico y monogaloil glucosa y los principales metabolitos de la fase II. Los compuestos ácido 4-O-metilgálico y ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato se identificaron previamente como los metabolitos predominantes después del consumo de ácido gálico (15,17) y por lo tanto se monitorizaron en plasma porcino durante un período de 10 h mediante la inserción quirúrgica de catéteres en la sangre en este estudio. Como patrón interno, se recuperó galato de etilo a $90,9 \pm 0,23\%$ en todas las muestras. El análisis farmacocinético no compartimental reveló la C_{max} para el ácido gálico y la monogaloilglucosa como $3,42 \pm 1,07$ mg/L y $0,13 \pm 0,05$ mg/L y un AUC de $3,57 \pm 0,07$ mg/L · h y $0,09 \pm 0,03$ mg/L · h, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 1. Transporte de 50 µg / ml de ácido gálico y monogaloil glucosa a través del lado apical a basolateral de las monocapas de Caco-2 durante 2 h.

	% Transport				Transport (µg/mL·h)
	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	
gallic acid	0.23 ± 0.05 ^{1,a}	0.52 ± 0.15 ^a	0.58 ± 0.15 ^a	0.67 ± 0.13 ^a	160 ± 59.4 ^a
monogalloyl glucose	0.10 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.72 ± 0.10 ^a	0.98 ± 0.14 ^a	

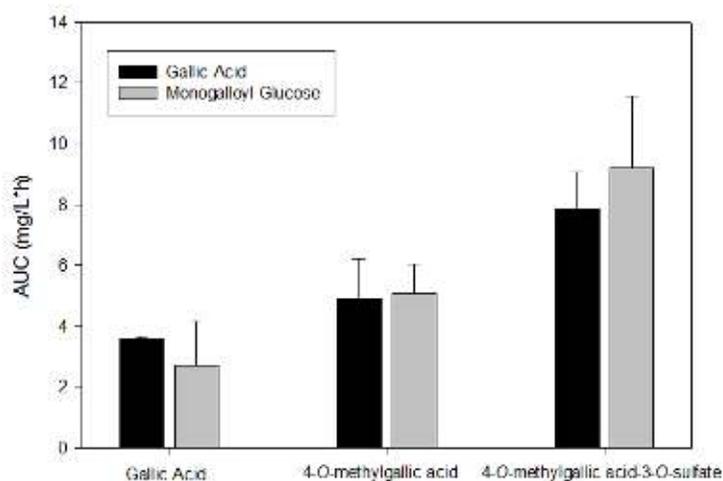
1. Los valores se reportan como la media ± SEM, y las letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos para el ácido gálico (GA) y la glucosa monogaloil (MGG) después de la administración oral y IV en un estudio experimental de absorción porcina, 10 h.

	Oral			IV			Bioavailabilit y_{abs}^1 (%)
	C_{max} (mg/L)	T_{max} (h)	AUC_{oral} (mg/L·h)	AUC_{IV} (mg/L·h)	Half-life (h)	V_d (L)	
GA	3.42 ± 1.07	0.5	3.57 ± 0.07	0.98 ± 0.20	0.10 ± 0.04	4.54 ± 1.1	19.3 ± 4.40
MGG	0.13 ± 0.05	0.5	0.09 ± 0.03	2.71 ± 1.31	0.34 ± 0.05	10.9 ± 2.18	

1. La biodisponibilidad absoluta se calculó usando $f = \frac{AUC_{oral} * Dose_{IV}}{AUC_{IV} * Dose_{oral}}$; con f como biodisponibilidad absoluta y AUC como área bajo la curva.

A pesar de una tasa de absorción similar en el modelo Caco-2, la glucosa monogaloil se encontró significativamente ($p < 0,05$) menos absorbida que el ácido gálico. El ácido gálico se eliminó rápidamente de plasma porcino con una vida media de $0,10 \pm 0,04$ h (6 min). En contraste, la monogaloilglucosa tuvo una vida media de $0,34 \pm 0,05$ h (20 min), y la biodisponibilidad absoluta para ácido gálico y monogaloil glucosa fue de $19,3 \pm 4,40\%$ y $0,28 \pm 0,20\%$, respectivamente. La rápida eliminación de ácido gálico y monogaloil glucosa del plasma es significativamente mayor cuando se compara con otros polifenólicos como el galato de epigalocatequina que cuando se administró por vía intravenosa en ratas se reportó que tenía una vida media de 51 min. (18). Esto sugiere que el ácido gálico es más biodisponible de lo que se pensaba anteriormente y debido a la corta vida media cualquier ácido gálico que se absorba sólo estará en circulación durante un corto tiempo antes de la excreción renal. Las investigaciones anteriores que informan sobre la farmacocinética del ácido gálico sólo han realizado experimentos de administración oral que carecen de datos de la administración intravenosa necesaria para calcular la biodisponibilidad absoluta, la relación entre la absorción oral y la depuración intravenosa. Este trabajo indicó que, en un modelo porcino, el ácido gálico tiene una biodisponibilidad absoluta cercana al 20%, y apoya investigaciones previas en las que se encuentran grandes cantidades de formas libres y metabolizadas de ácido gálico en la orina pero con bajas concentraciones en el plasma (19,20).



Cuadro 5. Área bajo la curva (AUC) para los metabolitos ácido gálico, ácido 4-O-metilgálico y ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato después de la administración oral de ácido gálico y monogaloilglucosa determinada en un modelo porcino

Los modelos farmacocinéticos clásicos, aunque útiles para medir la cinética del analítico de interés, no toman en consideración cambios en la concentración de analítico debido al metabolismo de fase II. Tanto el ácido gálico como la monogaloilglucosa se convirtieron en metabolitos de fase II con AUC para ácido gálico, ácido 4-O-metilgálico y ácido 3-O-sulfato de 4-O-metilgálico de $3,57 \pm 0,07$; $4,90 \pm 1,30$ y $7,86 \pm 1,18$ mg/L * h después de la administración oral de ácido gálico y $2,73 \pm 1,45$; $5,08 \pm 0,96$; y $9,19 \pm 2,38$ mg/L * h después de la administración oral de monogaloil

glucosa (Figura 5). Tanto el ácido gálico como la monogaloilglucosa produjeron una concentración similar de metabolitos de ácido gálico, pero no se detectaron conjugados de monogaloilglucosa de metilo, azufre o glucurónido. En el contexto de su alta bioaccesibilidad a partir del mango y el transporte de Caco-2, los datos sugieren que la glucosa monogaloil se absorbe in vivo, pero los metabolitos derivados no se detectan hasta que se produce la desglicosilación antes de ser encontrados en la circulación, ya sea en el intestino o el hígado. La glucosa monogaloil es el polifenol predominante en varias variedades de mango, y en la pulpa de mango Ataulfo analizada en este estudio, representó el 35% del contenido polifenólico total galico. La capacidad de la monogaloil glucosa de tener el mismo potencial metabólico que el ácido gálico libre es crítica ya que las diferencias de concentración entre el ácido gálico y la monogaloil glucosa entre los cultivares de mango pueden no afectar su bioeficacia.

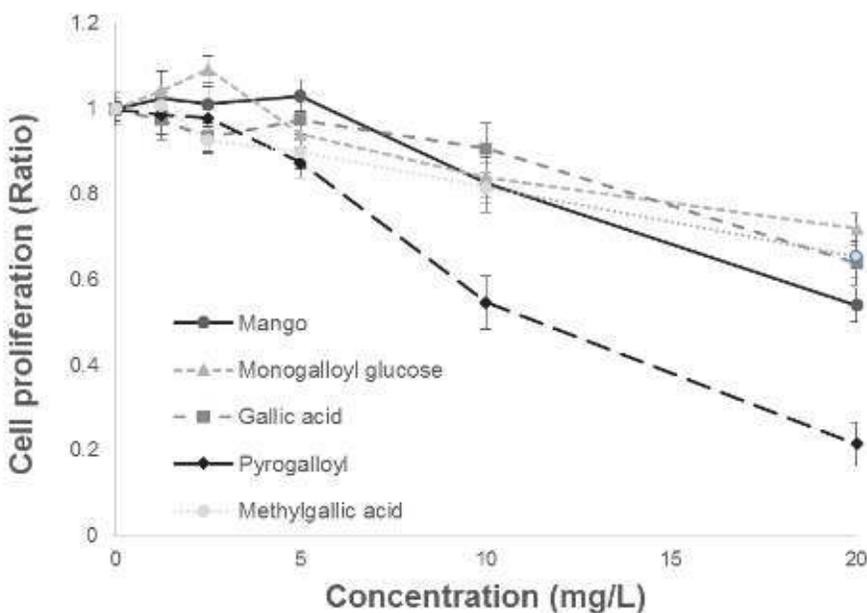


Figura 6. Efectos de los polifenoles de mango y sus metabolitos sobre la proliferación celular

Después de incubar los polifenoles del mango con la microbiota del cecum del cerdo, determinamos que el pirogalol es el metabolito principal. Tratamos células HT-29 con polifenoles de mango, incluyendo monogaloil glucosa y ácido gálico, así como los principales metabolitos pirogalol y ácido 4-metil gálico. En las células humanas de cáncer de colon, el pirogalol tenía más actividad anti-proliferativa que los compuestos parentales (Figura 6).

La IC50 de monogaloil glucosa, ácido gálico y ácido 4 - metil gálico fueron 31,95, 30,39 y 30,85, respectivamente. Estas concentraciones fueron superiores a la IC50 del extracto de mango (IC50 del extracto de mango: 22,75). Esto puede deberse a efectos sinérgicos de compuestos en polifenoles de mango. Curiosamente, el principal metabolito pirogalol tuvo la IC50 más baja (IC50 de pirogalol: 12,78). Esto sugiere que el metabolismo de polifenoles de mango aumenta la citotoxicidad.

En nuestro estudio piloto humano, se determinó que la mayoría de pirogalol en el plasma humano está en forma de pirogalol-sulfato. Determinamos a partir del ensayo previo de proliferación celular que sólo el pirogalol ejercía un efecto positivo

significativo sobre las células HT-29. Como resultado, sólo probamos los efectos del extracto de mango, pirogalol y sulfato de pirogalol sobre células epiteliales humanas CCD-18 inflamadas. El PG-O-sulfato fue tan eficaz como PG en la disminución de los niveles de ARNm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en fibroblastos CCD-18 tratados con LPS (Imagen 7). Esto demuestra que el principal metabolito de polifenoles de mango ejerce efectos anti-inflamatorios.

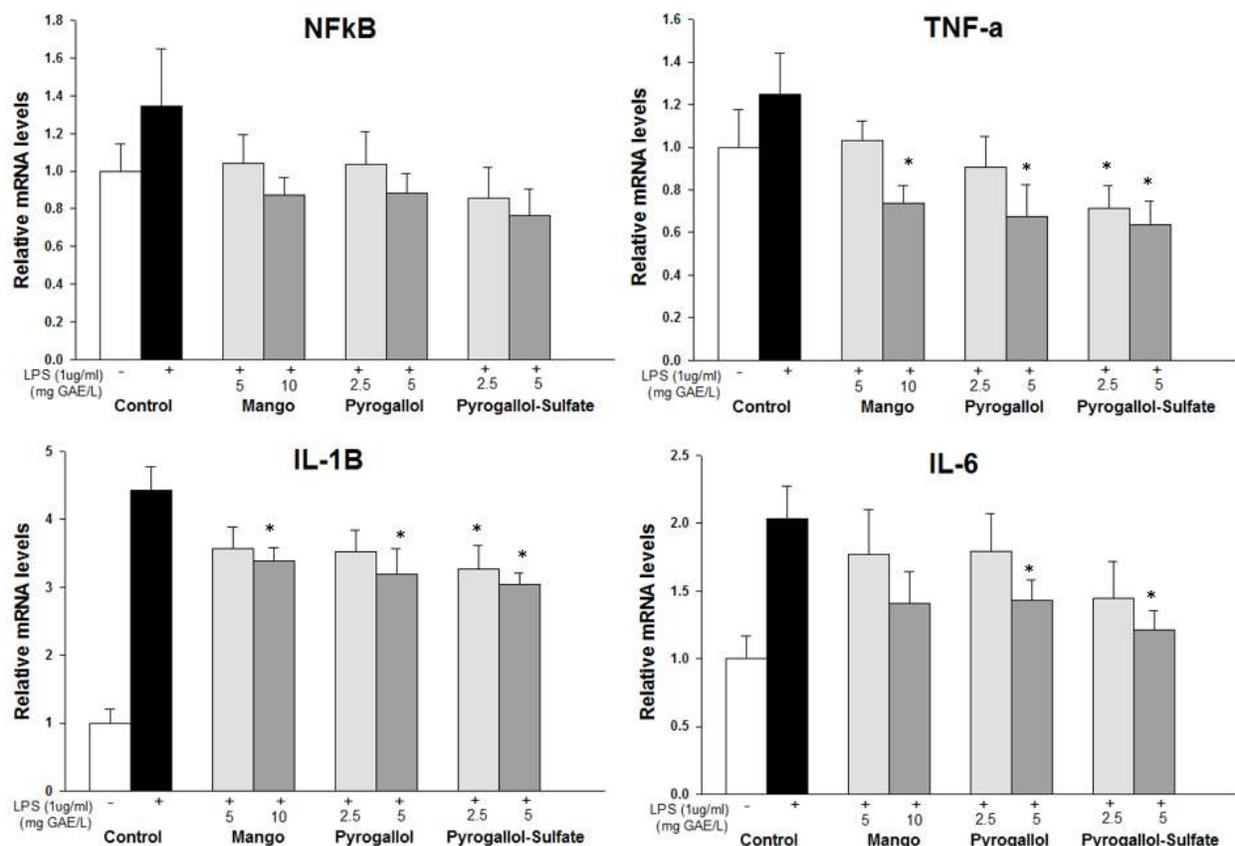


Figura 7. Efectos de los taninos y sus metabolitos en los niveles de ARNm de citocinas pro-inflamatorias en células CCD-18 tratadas con LPS

Referencias:

1. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 230S-242S.
2. Kamiloglu, S.; Capanoglu, E.; Bilen, F. D.; Gonzales, G. B.; Grootaert, C.; Van de Wiele, T.; Van Camp, J., Bioaccessibility of Polyphenols from Plant-Processing Byproducts of Black Carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**.
3. Ferruzzi, M. G.; Lobo, J. K.; Janle, E. M.; Cooper, B.; Simon, J. E.; Wu, Q.-L.; Welch, C.; Ho, L.; Weaver, C.; Pasinetti, G. M., Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *Journal Of Alzheimer's Disease: JAD* **2009**, *18*, 113-124.

4. Krenek, K. A.; Barnes, R. C.; Talcott, S. T., Phytochemical Composition and Effects of Commercial Enzymes on the Hydrolysis of Gallic Acid Glycosides in Mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Keitt') Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 9515-9521.
5. Bouayed, J.; Deußer, H.; Hoffmann, L.; Bohn, T., Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry* **2012**, *131*, 1466-1472.
6. Ten Have, G. A.; van der Pijl, P. C.; Kies, A. K.; Deutz, N. E., Enhanced Lacto-Tri-Peptide Bio-Availability by Co-Ingestion of Macronutrients. *PLoS one* **2015**, *10*, e0130638.
7. Noratto, G. D.; Angel-Morales, G.; Talcott, S. T.; Mertens-Talcott, S. U., Polyphenolics from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, *59*, 7999-8012.
8. Sáyago-Ayerdi, S. G.; Moreno-Hernández, C. L.; Montalvo-González, E.; García-Magaña, M. L.; Mata-Montes de Oca, M.; Torres, J. L.; Pérez-Jiménez, J., Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L) as a source of hydrolyzable tannins. Analysis by MALDI-TOF/TOF MS. *Food Research International* **2013**, *51*, 188-194.
9. Schieber, A.; Ullrich, W.; Carle, R., Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2000**, *1*, 161-166.
10. Friedman, M.; Jürgens, H. S., Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 2101-2110.
11. Englyst, H. N.; Hay, S.; Macfarlane, G. T., Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **1987**, *45*, 163-171.
12. Goel, G.; Kumar, A.; Beniwal, V.; Raghav, M.; Puniya, A. K.; Singh, K., Degradation of tannic acid and purification and characterization of tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2011**, *65*, 1061-1065.
13. Jimenez, N.; Reveron, I.; Esteban-Torres, M.; Lopez de Felipe, F.; de Las Rivas, B.; Munoz, R., Genetic and biochemical approaches towards unravelling the degradation of gallotannins by *Streptococcus gallolyticus*. *Microbial cell factories* **2014**, *13*, 154.
14. Han, Y. H.; Kim, S. Z.; Kim, S. H.; Park, W. H., Apoptosis in pyrogallol-treated Calu-6 cells is correlated with the changes of intracellular GSH levels rather than ROS levels. *Lung Cancer* **2008**, *59*, 301-314.
15. Hollman, P. C. H.; Bijlsman, M. N. C. P.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P. J.; de Vries, J. H. M.; Katan, M. B., The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* **1999**, *31*, 569-573.
16. Johnston, K.; Sharp, P.; Clifford, M.; Morgan, L., Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* **2005**, *579*, 1653-1657.
17. Yan, Z.; Chen, Y.; Li, T.; Zhang, J.; Yang, X., Identification of metabolites of Si-Ni-San, a traditional Chinese medicine formula, in rat plasma and urine using liquid chromatography/diode array detection/triple-quadrupole spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2012**, *885-886*, 73-82.
18. Chen, L.; Lee, M.-J.; Li, H.; Yang, C. S., Absorption, Distribution, and Elimination of Tea Polyphenols in Rats. *Drug Metabolism and Disposition* **1997**, *25*, 1045-1050.
19. Pimpão, R. C.; Ventura, M. R.; Ferreira, R. B.; Williamson, G.; Santos, C. N., Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *British Journal of Nutrition* **2015**, *113*, 454-463.
20. Pimpão, R. C.; Dew, T.; Figueira, M. E.; McDougall, G. J.; Stewart, D.; Ferreira, R. B.; Santos, C. N.; Williamson, G., Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research* **2014**, *58*, 1414-1425.