



Revisión

Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud

Francisco Javier Olivas-Aguirre¹, Abraham Wall-Medrano¹, Gustavo A. González-Aguilar², Jose Alberto López-Díaz¹, Emilio Álvarez-Parrilla¹, Laura A. de la Rosa¹ y Arnulfo Ramos-Jimenez¹

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. México.

Resumen

Introducción: Los taninos hidrolizables (TH) se han convertido en un tema de interés científico debido a su potencial nutraceutico. Tanto los galotanninos (GT) como los elagitaninos (ET) muestran diversas propiedades bioquímicas que, dentro del individuo que las consume, se traducen en diversos beneficios para la salud (e.g. anti-diabéticas, anti-mutagénica, antimicrobianas) asociados a su capacidad antioxidante (CAOX).

Objetivo: Analizar los aspectos más relevantes (aspectos bioquímicos, nutricionales/analíticos y efectos a la salud) reportados en la literatura científica sobre TH.

Métodos: Se realizó una búsqueda en diversas bases de datos (PubMed, Cochrane, ScienceDirect) y documentos de libre acceso (Google Scholar) sobre TH, GT y ET. Esta información fue posteriormente sub-clasificada en aspectos bioquímicos, nutricionales y analíticos (revisión narrativa) y efectos a la salud (revisión sistemática).

Resultados: La complejidad molecular y cantidad elevada de grupos hidroxilo (-OH) en un amplio universo de ET y GT es responsable no solo de una diversidad de métodos para su extracción y purificación sino también son responsables de diversos efectos pro- y anti-fisiológicos como la inhibición reversible de enzimas, secreción proteica, CAOX y efectos antiproliferativos.

Conclusiones: La asociación de ET y GT con diversas biomoléculas presentes en los alimentos y/o macromoléculas del tracto digestivo, limitan en muchos casos la propia CAOX de estos compuestos pero en cambio permiten la distribución diferencial de GT y ET a distintos órganos blanco de tal forma que sus efectos en la salud aparentemente son diferenciales.

(Nutr Hosp. 2015;31:55-66)

DOI:10.3305/nh.2015.31.1.7699

Palabras clave: *Taninos. Galotanninos. Elagitaninos. Cáncer. Antioxidantes.*

HYDROLYZABLE TANNINS; BIOCHEMISTRY, NUTRITIONAL & ANALYTICAL ASPECTS AND HEALTH EFFECTS

Abstract

Introduction: Hydrolysable tannins (HT) have been of scientific interest because of their nutraceutical potential. Both gallotannins (GT) and ellagitannins (ET) show different biochemical properties that result in various health benefits (eg anti-diabetic, anti-mutagenic, anti-microbial) for consumers, all associated with their antioxidant capacity (AOXc).

Objective: To analyze the most relevant aspects (biochemical, nutritional/analytical and health effects) of HT reported in the scientific literature.

Methods: A systematic search was conducted in several databases (PubMed, Cochrane, ScienceDirect) and free-access repositories (Google Scholar) on HT, GT and ET. This information was further sub-classified into biochemical, nutritional and analytical aspects (narrative review) and health effects (systematic review).

Results: The high molecular complexity and amount of hydroxyl groups (-OH) in both ET and GT, are responsible not only for a plethora of methods for extraction and purification but also for the several pro-and anti-physiological effects of them such as enzyme inhibitions, protein excretion stimulation, AOXc and anti-proliferative effects.

Conclusions: The association of ET/GT with several macromolecules present in foodstuffs and the digestive tract, counteract the AOXc of these compounds but conversely allow the differential distribution of GT and ET to different target organs in such way that their health effects seems to be different.

(Nutr Hosp. 2015;31:55-66)

DOI:10.3305/nh.2015.31.1.7699

Key words: *Tannins. Gallotannins. Ellagitannins. Cancer. Antioxidants.*

Correspondencia: Abraham Wall-Medrano.
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
México.
E-mail: awall@uacj.mx

Recibido: 21-VI-2014.
Aceptado: 23-VII-2014.

Abreviaturas

β -PGG:	β -1,2,3,4,6-Pentagaloil-O-Glucopiranos
CAOX:	Capacidad antioxidante
CPF:	Compuestos poli fenólicos
ET:	Elagitaninos
F/V:	Frutas y vegetales
FT:	Florotaninos
GT:	Galotaninos
HeT:	1-0-galoilo-2,3;4,6-bis-hexahidroxidifenoil- β -D-glucopiranos
HHDP:	Acido hexahidroxifenico
ORAC:	Oxygen radical absorbance capacity
PPO:	Polifenol oxidasa
PRP:	Proteínas ricas en prolina
TC:	Taninos condensados
TH:	Taninos hidrolizables
TT:	Taninos totales

Introducción

Después de la Segunda Guerra Mundial, los compuestos polifenólicos (CPF) gradualmente se convirtieron en un tema de interés en diversos campos de investigación como los son la agricultura, la ecología, la alimentación y la medicina^{1,2}. Desde los trabajos pioneros realizados en los 50's, el desarrollo científico ha conducido al establecimiento de una de las líneas de generación y aplicación de conocimientos más prometedoras en el terreno de la alimentación funcional: Los CPF de plantas. A la par de este avance, el reconocimiento público ha impulsado la producción y consumo de productos básicos como frutas, vegetales y semillas^{3,4} y la producción de nuevos productos adicionados/fortificados con CPF en la industria de refrescos y bebidas⁵, panificados⁶ e incluso de origen animal.

Dentro de las investigaciones sobre CPF, se encuentran aquellas sobre sus formas poliméricas: los taninos. Extraídos de plantas y algas, la mayor parte de estos se clasifican en base a su monómero base (e.g. ácido gálico, ácido elágico, flavan-3-oles y floroglucinol). Estos se ensamblan en estructuras poliméricas de alto peso molecular, con distinta capacidad de unión a proteínas u otras macromoléculas⁷ y susceptibilidad a la hidrólisis química o enzimática en condiciones *in vitro* lo que determina su clasificación en taninos "condensados" (TC, proantocianidinas), hidrolizables (TH, galo- y elagi-taninos) y complejos^{8,9}.

Los TC muestran diversas propiedades físicas y químicas que, dentro del organismo que las consume, se traducen en diversas actividades biológicas¹⁰: Propiedades antioxidantes, quimio-terapéuticas, anti-inflamatorias y antimicrobianas. Sin embargo, por su incapacidad para ser hidrolizados, se les ha involucrado en diversas actividades antinutricionales (e.g. secuestro de micronutrientes). Los TH, por el contrario, al poseer un núcleo glucídico (generalmente glucosa), son más susceptibles a hidrólisis en condición fisiológica,

permitiendo la liberación gradual de sus componentes primarios^{11,12}. Diferentes TH aislados de plantas comestibles y no comestibles, han mostrado una fuerte capacidad biológica como anti-tumorales, anti-mutágenos, anti-diabéticos y antibióticos, teniendo esta última capacidad un impacto conveniente en la vida de anaquel de alimentos preparados con TH¹. Sin embargo, su capacidad de hidrólisis también resulta ser un defecto cuando el alimento se procesa, sufre transformaciones o cuando se le almacena^{13,14}. Estas y otras cuestiones bioquímicas y analíticas son abordadas en la presente revisión narrativa.

Bioquímica

Estructura y clasificación de taninos. Los CPF comprenden una amplia gama de sustancias que poseen al menos un grupo hidroxilo (-OH) en uno o más anillos fenólicos. Dentro de estos se encuentran los taninos, que resultan ser el subgrupo de CPF posiblemente de mayor tamaño. El término tanino fue originalmente utilizado para describir ciertas sustancias orgánicas que servían para curtir pieles de animales, proceso conocido en inglés como *tanning*^{2,9}. Actualmente, este término ha sido ampliamente aceptado para nombrar un grupo bastante heterogéneo de CPF de masa molecular relativamente alta (500-20000 Da) y de complejidad elevada (12-16 hidroxilos en 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 Da^{2,8}. Químicamente se definen como: "*Metabolitos secundarios derivados de plantas que pueden ser ésteres de ácido gálico o sus derivados unidos a una amplia variedad de poli oles, catequina o núcleos triterpenoides [galotaninos (GT), elagitaninos (ET) o taninos complejos], o bien oligómeros o polímeros de proantocianidinas que pueden poseer diferente acoplamiento inter-flavonil u otros patrones de sustitución (TC)*". Sin embargo, por convención, diversos autores clasifican a los taninos en cuatro grupos: los condensados (TC, origen flavonoide), los hidrolizables (TH, origen no flavonoide)^{2,8}, los florotaninos (FT, derivados de algas café) y los taninos complejos. Los taninos son conocidos por su capacidad para unirse a otras macromoléculas como los hidratos de carbono¹⁵ y las proteínas¹⁶ mediante fuerzas covalentes y no covalentes⁷ y por su astringencia y sabor amargo¹⁷, pero estas propiedades son dependientes del tipo de tanino, como se habra de revisar en secciones posteriores.

Los TC son el resultado de la polimerización de unidades de flavan-3-ol como la catequina (Fig. 1a), la epicatequina o la leucocianidina unidos mediante enlace C-C y carentes de un núcleo glucídico¹⁸. Los tres grupos representativos de TC son las procianidinas (Fig. 1b), proantocianidinas (Fig. 1c), prodelfinidinas y profisetinidinas². Los TH por su parte, están compuestos de ésteres de ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico, Fig. 1d) o el ácido elágico (4',5,5',6,6'-ácido hexahidroxidifenico-2,6,2',6'-dilactona; Fig. 1h) unidos a una unidad central de carbohidrato¹² y su nombre

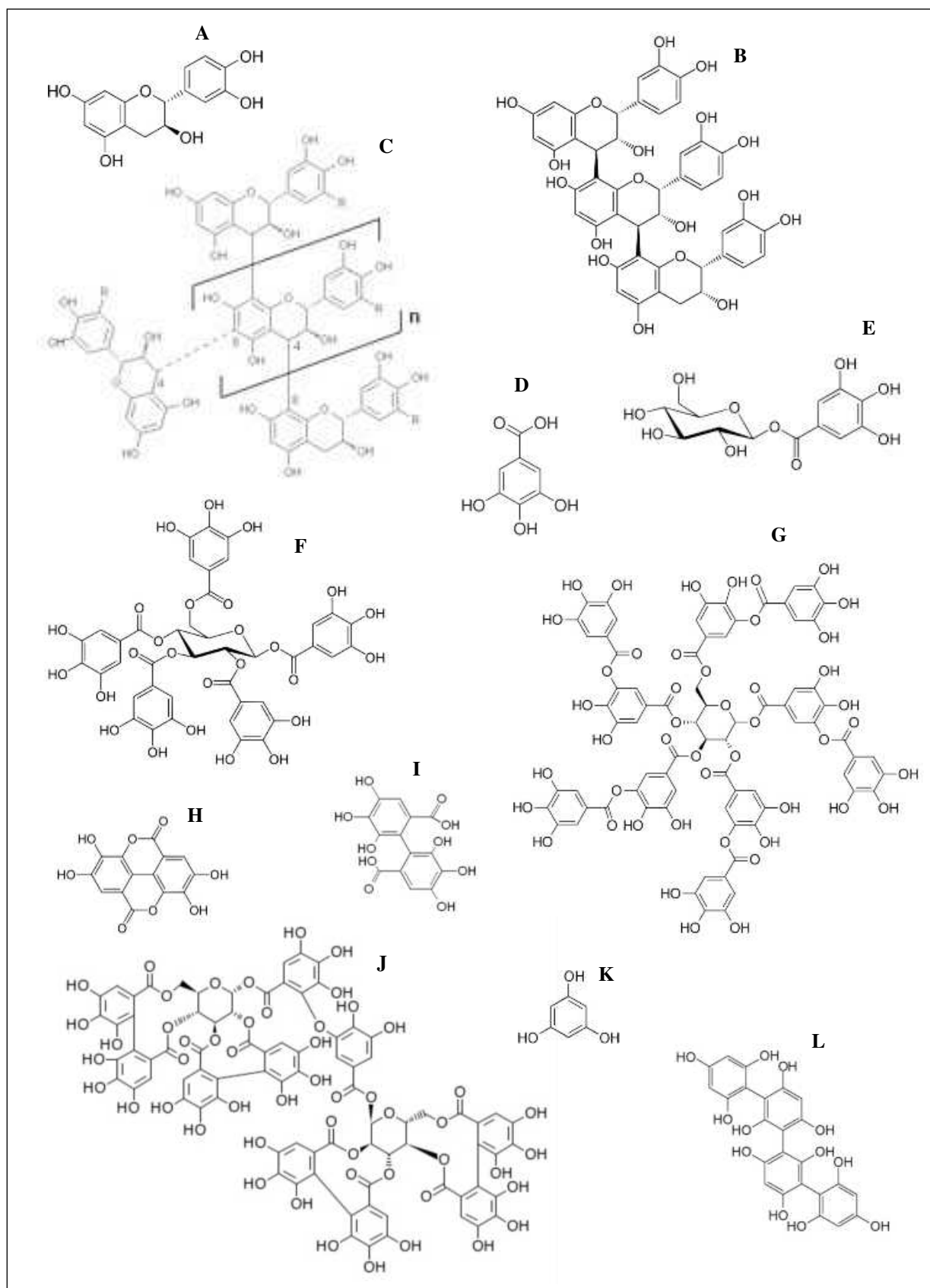


Fig. 1.—Estructuras representativas de taninos condensados (TC), hidrolizables (TH) y florotaninos (FT) y sus precursores. Ver siglas en sección de abreviaturas y nombre de estructuras en texto.

hace referencia a su fácil capacidad para hidrolizarse en presencia de ácidos, bases o enzimas tanto *in vitro*¹⁹ como *in vivo*¹¹.

Los GT son considerados como las formas más simples de los TH. Son ésteres del ácido gálico y del ácido di gálico unidos entre sí por enlaces ésteres entre el carboxilo (-COOH) de uno de ellos y el -OH del otro y a su vez unidos a hexosas como la glucosa mediante un enlace anomérico beta, pues la forma alfa no es común en la naturaleza¹², aunque a nivel laboratorio se pueden producir a conveniencia y bajo reacciones controladas, isómeros alfa²⁰. La β -glucogalina (1-O-galoil- β -D-glucopiranososa; Fig. 1e) es la forma más simple de GT y sirve como donador de su unidad galoil para la síntesis de otros GT más complejos^{12,21}, como la β -1,2,3,4,6-Pentagaloil-O-Glucopiranososa (β -PGG, Fig. 1f). La diversidad estructural de los GT está determinada por: a) Cada uno de los enlaces éster que se encuentren en la molécula glucídica (e.g. 5 para formar β -PGG) y b) Por los enlaces depsídico (*meta- o para-*) dados por las unidades de ácido gálico al unirse con otra molécula de ácido gálico para formar un éster cada vez de mayor tamaño como el ácido tánico (Fig. 1g)²². Cabe señalar que existen otros derivados de ácido gálico que por estar unidos a ácido quínico que no se agrupan dentro de los GT sino forman parte de otro grupo especial denominado *tarataninos*^{1,23}, los cuales son extraídos de la "tara" (*Caesalpinia spinosa*).

Los ET se forman a partir del ácido hexahidroxidifénico (HHDP, Fig. 1i), el cual al ser hidrolizado se deshidrata espontáneamente para formar el ácido elágico (Fig. 1h)²⁴. El primer ET aislado de plantas fue la agrimonina (Fig. 1j) a partir de *Agrimonia pilosa* y *Pontetilla kleiniana*²⁵. La estructura de un ET puede presentar diversos puntos de polimerización por esterificación, al igual que los GT, tanto en la molécula glucídica como en los grupos HHDP disponibles, lo que le da la posibilidad de formar estructuras de mayor peso molecular en comparación a los GT^{26,27}.

La capacidad de polimerización tanto de los GT como los ET parece ser infinita. Este aspecto escapa del propósito de la presente revisión, sin embargo existen excelentes reportes por otros autores². Valga decir por lo pronto que la unión glicosídica de, por ejemplo, una unidad de catequina a un GT o ET, caracteriza a los taninos complejos²⁸. Por último, Los taninos presentes en las de algas café (feofitas)²⁹ están compuestos de unidades de floroglucinol (1, 3,5-trihidroxibenceno; Fig. 1k). A estos se les conoce como florotaninos (FT). Los FT abarcan una amplia gama de TH de diverso tamaño molecular (de 126 Da a 650 kDa)³⁰ y se puede subdividir en seis grupos específicos como los fucoles (Fig. 1l), floretoles, fucofloretos, fuhaloles, isofuhaloles y eckoles, caracterizados por una amplia gama de arreglos de sus unidades de floroglucinol y de grupos hidroxilo presentes³¹ así como un amplio rango de pesos moleculares (400-400,000 Da).

Biosíntesis y función de TH en plantas. Todos los TH son sintetizados por la vía del ácido shikímico

(también conocida como la vía fenilpropanoide) y posteriormente por la vía de la β -PGG (Fig. 2). Al producirse el ácido gálico por la vía fenilpropanoide este se esterifica con una molécula de UDP-glucosa mediante la enzima glucosil transferasa para dar β -glucogalina, primer intermediario y metabolito clave en la ruta biosintética de los TH. La β -glucogalina puede desempeñar un doble papel ya sea como donador de acilo con el fin de formar poligaloil-glucosidos (di-, tri-, tetra, etc) o bien como aceptor de 4 moléculas de ácido gálico para formar β -PGG. En turno, β -PGG puede establecer un nuevo enlace éster (*m*-depside) con otro ácido gálico y dar pie a compuestos derivados hexa-, hepta-, octa-galoil glucosa e incluso de mayor número de residuos galoilo¹.

Sin embargo, la ruta biosintética de los GT, no es tan simple como parece. En la actualidad se han identificado diversas enzimas capaces de catalizar la esterificación de ácido gálico en diferentes estadios de su síntesis. Denzel y Gross³² trabajaron con extractos de hojas de zumaque (*Rhus typhina* L.), donde se identificó una enzima capaz de transferir un grupo 1-O-galoil a la posición 2 del 1, 6-di- O-galoil- β -D-glucosa, obteniéndose 1,2,6-tri-O-galoil- β -D-glucosa y 6-O-galoil glucosa como subproducto. El nombre sistemático 1,6 - di-O-galoil glucosa 2-O-galoil transferasa fue propuesto para esta nueva enzima cuya detección proporcionó evidencia de que, además de β -glucogalina, los ésteres de glucosa superiores pueden ser potenciales donadores de acilo en la biosíntesis de GT. Sin embargo, la naturaleza bioquímica, especificidad de reacción y constantes cinéticas de la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis de GT (en la Fig. 2 identificadas de forma genérica como EC.2.3.1.^{A-J}) todavía se encuentran en estudio. Por si esto fuera poco, β -PGG también puede establecer enlaces C-C o C-O entre residuos galoilo por acoplamiento intra o intermolecular

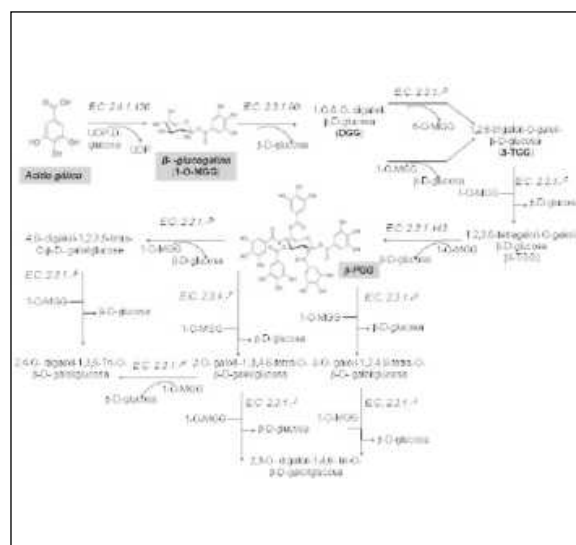


Fig. 2.—Biosíntesis de galotaninos (GT). Fuente: Elaboración propia.

para formar ET¹². La oxidación de los grupos galoi- los de β -PGG es realizada por una polifenol oxidasa (PPO), la cual acopla en posición 6 a dos grupos galoi- los para formar el grupo hexahidroxidifenoil (HHDP).

La producción de TH dentro de las plantas mues- tra un pico máximo cuando la tasa de crecimiento de estas disminuye³³. Sin embargo estos compues- tos pueden producirse en mayor cantidad cuando las condiciones ambientales son adversas, es decir, estos “metabolitos secundarios” cumplen funciones de de- fensa, ante depredadores (por ejemplo, herbivorismo) o anti microbianas por mencionar algunos ejemplos²⁵. Los principales mecanismos de acción se le atribuyen a la inhibición de enzimas, acciones sobre las mem- branas (en el caso de los microorganismos) o priva- ción de sustratos³⁴. Por ejemplo, Mamaní y colabores³⁵ observaron la incompatibilidad entre la planta de fresa y un patógeno (*Colletotrichum fragariae*), provocada por un aumento en las concentraciones de CPF en las hojas, particularmente un ET, el 1-0-galoi- lo-2,3;4,6-bis-hexahidroxidifenoil- β -D-glucopiranos (HeT), el cual a través de cascadas de señalización puede actuar como antiséptico natural al inhibir la catalasa y aumentar las concentraciones de peróxido de hidrógeno en los patógenos causando muerte celu- lar^{36,37}. En el caso del pastoreo (herbivorismo), se ha observado que se concentran gran cantidad de taninos principalmente en los frutos inmaduros o donde existen hojas jóvenes, los cuales son considerados tóxicos y reletos de depredadores o antinutrientes para los humanos por su capacidad de establecer interacciones con otras macromoléculas, en particular proteínas ricas en prolina³⁸.

Interacciones moleculares de taninos. Con la finali- dad de comprender el tipo de interacciones que esta- blecen los TH con otras macromoléculas, se han utili- zado varios acercamientos experimentales. Goldstein y Swain³⁹ realizaron un experimento sencillo basado en la actividad enzimática de la β -glucosidasa (por su origen proteico) en presencia de ácido tánico, un TH inhibidor de esta enzima, en presencia y ausencia de detergentes. Sus experimentos revelaron que la inhibi- ción puede revertirse a mayor carga iónica, poniendo de manifiesto la naturaleza no covalente de estas inte-

racciones. Posteriores estudios revelaron la importan- cia de los grupos amida y contenido de prolina de las proteínas y los anillos fenólicos de los CPF así como otro tipo de interacciones tanto débiles (e.g. van der Waals, interacción hidrofóbica) como fuertes (e.g. co- valentes) y su susceptibilidad a temperatura, pH, tipo y concentración de proteína así como el tipo y estructura de CPF que se estudie^{38,40}.

Los taninos de alto peso molecular son mejores para precipitar proteínas que los taninos más peque- ños. Además, el pH ácido favorece la formación de complejos proteína-tanino, mientras que un pH básico (por encima del pKa de los grupos hidroxilo fenólicos; por ejemplo, pH > 9), ioniza los grupos hidroxilo; por tanto, disminuye considerablemente la formación de puentes de hidrógeno, y la precipitación de proteínas no se producen fácilmente⁴¹. En cualquier caso, las in- teracciones covalentes entre TH y proteínas son mucho mas complejas que las interacciones no covalentes.

Aspectos alimentarios y analíticos

TH en alimentos. La presencia de TH (y en general de todos los CPF) en las plantas y frutos comestibles depende en gran medida de distintos factores tales como el tipo, variedad y especie del fruto comestible, su estado de madurez y diversas condiciones ambien- tales. Cabe señalar que mientras los GT tienen un es- pectro de distribución muy restringido en las plantas (y todavía más en aquellas comestibles) los ET tienen mayor distribución^{1,25}. La concentración de CPF y en particular de TH en los alimentos varía entre 1 (ave- llanas) a 2000 mg/kg (en mora), siendo las vallas las fuentes dietéticas más abundantes en estos compues- tos^{1,4}. Los alimentos con mayor contenido de TH (GT y ET) se muestran en la Tabla I donde además se mues- tra la capacidad antioxidante (CAOX) determinada por el método de capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC, por sus siglas en ingles).

Cabe señalar en este sentido que la CAOX de un fruto en particular resulta de la sinergia entre el con- tenido de taninos (TH y TC), los CPF monoméricos (e.g. flavonoides y ácidos benzoicos) y otras especies antioxidantes como los carotenoides, ácido ascórbico

Tabla I
Alimentos con alto contenido de taninos hidrolizables (TH)

Fruto	TH	ORAC	Fruto	TH	ORAC
Almendra	GT/ET	418	Mango	GT	101
Arándano	GT/ET	503	Mora	GT/ET	477
Frambuesa	ET	414	Nueces	GT/ET	269 – 2016
Fresa	GT/ET	332	Uva	ET	145
Granada	GT/ET	338			

Galotanino (GT), elagitaninos (ET), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC, μ M equivalentes de trolox/100g); Fuente^{1,4,59,65-69}.

y tocoferoles de tal suerte que la correlación entre la CAOX de un fruto casi siempre correlaciona mas con el contenido de estos últimos mas que con el contenido de taninos. En cualquier caso, el contenido de taninos y en especial de TH aparte de su participación con agente antioxidante, por su demostrado efecto antimicrobiano²⁵ también contribuye con la mejora en la vida de anaquel de productos manufacturados con fuentes ricas en TH¹. Sin embargo, su capacidad de hidrólisis también resulta ser un defecto cuando el alimento se procesa, sufre transformaciones o cuando se le almacena por tiempo prolongado^{13,14}.

TH en la dieta. De los pocos estudios reportados al momento en donde se evalúa el consumo habitual de antioxidantes y compuestos poli fenólicos (CPF), compuestos con actividad antioxidante mayor que las vitaminas y minerales, demuestran no solo que la participación de los CPF totales (mg equivalentes de ácido málico/día) en la dieta de americanos (450 mg), españoles (820 mg), mexicanos (843 mg), finlandeses (863 mg), polacos (1102 mg), franceses (1193 mg) y griegos (1306 mg) sino que esta ingesta es dependiente del tipo de alimento de la dieta habitual⁴². Café, vino tinto y te parecen ser los principales contribuidores a la ingesta de TC (~100-200 mg/día) y ácidos fenólicos (300-600 mg/día) e hidroxí cinámicos (200-500 mg/día), curiosamente en los países de mayor consumo de CPF. Sin embargo, el consumo de TH no se ha registrado, aunque en países de clima tropical se supone alto por ser justamente los frutos tropicales y las bayas silvestres los mayores aportadores (Tabla I)^{1,4,65-69}.

Aislamiento, purificación, identificación y cuantificación (APIC). En la producción de compuestos nutraceuticos a base de TH con potencial funcional para el tratamiento de diversas patologías humanas o bien para la elucidación estructural de estos resulta indispensable la selección estratégica de técnicas APIC que maximice la obtención eficiente de TH. Esto se justifi-

ca sobre el hecho de que las propiedades bioquímicas como la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, su comportamiento cromatográfico⁴³, propiedades bioquímicas/fisicoquímicas⁷ o función biológica²⁵ de los taninos son dependientes de su complejidad estructural. Por esto, las metodologías para el aislamiento y purificación de taninos (TC y TH) reportadas en la literatura son muy diversas. Por ejemplo, su aislamiento a partir de muestras frescas, liofilizadas, secadas al aire, y el tamaño de partícula inicial determina no solo el rendimiento de extracción sino también la especie de TH o TC que se desee obtener^{1,8}. La mejor opción sin lugar a dudas es el análisis de la muestra fresca sin embargo también es la menos factible a nivel industrial. Con el secado al aire puede ocurrir descomposición de los CPF (incluyendo los TH) al contacto directo con los rayos solares y altas temperaturas por lo que la liofilización representa la mejor opción para la concentración de TH de frutos comestibles⁴⁴, aunque a nivel laboratorio.

Una vez concentrada la fuente, por perdida de agua en el mayor de los casos, la purificación se inicia con una selección cuidadosa del sistema de solventes de extracción. En el caso de frutos con contenido lipídico alto (e.g. aguacate o nueces) se utilizan de forma primaria solventes como hexano o dicloro metano, mismos que por su carácter hidrofóbico no extraen, o lo hacen mínimamente, TC o TH aunque su efecto en la modificación estructural de estos o de sus interacciones con otras macromoléculas puede ocurrir. Posteriormente se usa metanol, etanol o acetona puros, en combinación, o en soluciones acuosas de distinta proporción para aislar los CPF extraíbles de baja complejidad molecular¹ y en menor escala de TH y TC.

De la selección correcta de solventes dependerá el rendimiento en la extracción de los diversos CPF. Por mencionar solo un ejemplo, Poovarodom y colabo-

Tabla II
Extracción de compuestos fenólicos (CF) de Mangifera indica L a efecto de distintos solventes

	<i>Metanol</i>	<i>Agua</i>	<i>Acetona</i>	<i>Hexano</i>
CF				
FT	3.79±0,2 ^b	3.79±0,2 ^b	1,48±0,05 ^a	0,16±0,01 ^c
FV	0,412±0,02 ^a	0,12±0,00 ^b	0,872±0,04 ^c	0,031±0,00 ^d
FVN	2,03±0,1 ^a	31,02±1,6 ^b	17,22±0,9 ^c	18,19±1,0 ^c
TAN	1,86±0,09 ^c	0,68±0,03 ^b	0,12±0,01 ^a	2,05±0,11 ^c
CAOX				
ABTS	27,31±1,3 ^c	25,54±1,3 ^c	12,24±0,5 ^b	5,28±0,3 ^a
CUPRAC	20,06±1,1 ^c	19,34±0,9 ^c	16,26±0,8 ^b	0,18±0,01 ^a
FRAP	7,45±0,4 ^a	11,85±0,5 ^b	2,81±0,1 ^c	0,86±0,04 ^d
DPPH	10,0±0,5 ^a	27,31±1,3 ^b	5,22±0,2 ^c	2,01±0,1 ^d

Fenoles totales (FT, mgEAG/g), flavonoides (FV, mgEQ/g), flavonoles (FVN, mgEQ/g), Taninos (TAN, mgEQ/g); Fuente⁴⁵

radores⁴⁵ evaluaron la composición de bioactivos de mango extraídos con distintos solventes y caracterizados por HPLC-3D-FL y CAO total (Tabla II). Sus resultados demostraron una mejor extracción de fenoles totales (FT) con agua y metanol, de flavonoides (FV) y de flavanoles (FVN) con agua y hexano y de taninos totales (TT) con metanol y hexano mientras que Dorta y colaboradores⁴⁶ encontraron una menor eficiencia de metanol:agua (1:1) en comparación a metanol absoluto en la extracción de TT y TC. Por último, se ha sugerido la adición de ácido ascórbico así como la extracción en atmósferas de Argón para la protección de los TH de su posible oxidación. Las bajas temperaturas también favorecen la estabilidad de los TH quienes pueden hidrolizar residuos de ácido gálico y elágico^{1,44}.

La selección de técnicas de cuantificación también merece atención al momento de obtener datos reproducibles sobre el contenido de TH en alimentos. La selección de filtros de purificación, el empleo de solventes de elución, el pretratamiento de muestras puras (e.g. hidrólisis de enlaces glicosídicos) y los métodos cromatográficos y detección molecular son solo algunos aspectos a cuidar⁴⁷. Sobre estos últimos destacan diversas métodos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF)^{42,48,49}. Normalmente los métodos por HPLC se realizan en fase normal y se usan Sephadex H20 y distintas soluciones de metanol, acetonitrilo y agua; adicionando a esta última ácido acético o fórmico con la finalidad de aumentar la resolución de los cromatogramas¹², mientras que cuando se trabaja en fase reversa se usan columnas de C₈ o C₁₈. Sin embargo, distintos autores han encontrado dificultad en los cromatogramas al trabajar con fase reversa, dichos problemas se atribuyen a los isómeros anoméricos y la formación de acetal en los eluyentes alcohólicos de la HPLC⁴⁴. Por último, el análisis por MALDI-TOF permite el análisis de moléculas orgánicas utilizando una matriz sólida como el ácido 2,5-dihidroxibenzoico y un agente cationizante como el cloruro de sodio o trifluoroacetato de cesio, para el caso de la identificación de TH⁴⁸. Por último, aunque los métodos para identificación señalados anteriormente, bajo la premisa de que los mismos requieren de estándares de TH puros, pueden ser utilizados para la cuantificación del contenido total y específico de TH, existen métodos calorimétricos más prácticos como lo son los Folin-Ciocalteu, rodanina y iodato de potasio⁵⁰⁻⁵².

Efectos en la salud

Bio accesibilidad, biodisponibilidad y metabolismo. Primario a la búsqueda de los posibles efectos biológicos locales (tracto gastrointestinal) o sistémicos (órganos internos), lo que en la literatura científica se conoce como *biodisponibilidad*, resulta indispensable garantizar la completa liberación de los TH de la ma-

triz alimentaria que los contiene (*bioaccesibilidad*). En términos generales, cuando se ingieren F/V, los CPF interactúan con la matriz alimentaria mediante fuerzas débiles (extraíbles) o fuertes (no extraíbles), muy en específico con los carbohidratos complejos⁵³⁻⁵⁵ y proteínas¹⁹. Una vez liberados, los CPF pueden asociarse a otras biomoléculas presentes en el tracto gastrointestinal provocando la inactivación y/o no biodisponibilidad tanto de del CPF sino también de la biomolécula con la que se asocia.

Con la masticación se degradan las paredes celulares de F/V y con esto la liberación precoz de los taninos de las vacuolas que los almacenaban. Posteriormente, de forma estructura-dependiente, los TH y los TH reaccionan con las proteínas salivales ricas en prolina (PRP)⁵⁶⁻⁵⁸ y con otras biomoléculas de las secreciones orales (e.g. mucina, amilasa lingual). Skopec y colaboradores⁵⁶ evaluaron en ratas acostumbradas (Grupo 1) y no (Grupo 2) a la ingesta habitual de TH, el patrón de secreción PRP's y su interacción con β -PGG (3% g/100g dieta), utilizando una forma isotópica de este último marcado (C¹⁴, 1 μ C1/g dieta) como marcador. En las ratas del grupo 2, la adición de β -PGG no provocó diferencia alguna en la digestibilidad aparente de la dieta y compuestos nitrogenados pero en aquellas del grupo 1 se encontró una reducción del 7% y 25%, respectivamente. Este fenómeno se asoció a una excreción más evidente de prolina (asociado a una mayor producción de PRP) y las dos formas de β -PGG suministradas en las ratas del grupo 1 en comparación a las del grupo 2. Los autores especularon sobre una interacción PRP-(β -PGG) fuerte de tal suerte que β -PGG resiste la degradación oral, estomacal y en intestino delgado, minimizando con ello los posibles sus posibles efectos adversos durante su tránsito gastrointestinal.

Soares y colaboradores⁵⁷ informaron posteriormente que β -PGG (TH) y un trímico C2 de procianidina (TC) son igualmente capaces de interactuar con PRP's ácidas formando complejos solubles (TC) e insolubles (TH) pero solo β -PGG tenía afinidad, aunque pobre, por PRP's básicas y glicosiladas. Por su parte, Da Costa y colaboradores⁵⁸ ensayaron el efecto inductor de dietas al 5% (w/w) con ácido tánico (TH) o extracto de *Quebracho* (72% de TC) en la expresión de proteínas salivales (por MALDI-TOF) y cambios morfológicos en los acinos de las glándulas parótidas de ratones Bla-b/c jóvenes. Los TH y TC ensayados provocaron el mismo aumento en la superficie acinar y secreción de α -amilasa pero TC provocó una mayor secreción de la enzima aldehído reductasa. Estas tres investigaciones evidencian claramente los efectos diferenciales entre los TC y los TH en la etapa oral de la digestión.

Los TH en interacción o no con proteínas y/o carbohidratos tanto de la matriz alimentaria como de la cavidad oral, son conducidos al estómago e intestino delgado. La acidez y presencia de pepsina en el estómago minimizan la interacción de los TH con los grupos

funcionales de otras moléculas orgánicas y alimentarias⁵³⁻⁵⁵ pero no provocan la hidrólisis e inactivación de TH^{59,60}. Con el cambio a pH neutro ocurrido en el intestino delgado, β -PGG es inestable como molécula antioxidante⁶⁰. Sin embargo, β -PGG pero no epigallocatequina-*O*-galato permanece estable en presencia de los diversos componentes del jugo biliar/pancreático + alimentos ricos en fibra soluble (e.g. alimentos para bebe) pero no insoluble (e.g. cereales). En consecuencia, solo las moléculas de bajo peso molecular (como ácidos fenólicos derivados de los TH) pueden atravesar y ser directamente absorbidos a través de la mucosa del intestino delgado y pasar al torrente sanguíneo⁶¹. Sin embargo, existen excepciones a esta regla: Cerda *et al.* (2003), informaron que la punicalagina, un ET aislado de granada, ha sido la molécula biológica mas grande (~1,804 UMA) en absorberse en intestino murino.

Se estima que la absorción de TH (en su mayoría por transporte activo) es muy baja. Larrosa y colaboradores⁵⁹ observaron una retención de ET's de hasta un 50% dentro del intestino 24 horas posterior a su ingesta. Por tal razón, se especula que los TH liberados a nivel intestinal y aquellos que formaban parte de estructuras macromoleculares con PRP's, pasan íntegros al intestino grueso donde pueden ser susceptibles a transformación enzimática por la flora colonica. Enzimas como la β -glucosidasa, la tanin-acil-hidrolasa y elagitanin-acil-hidrolasa (elagitanasa) pueden hidrolizar los ET y GT a sus monómeros. El ácido elágico puede ser entonces metilado por la enzima Catecol-O metil transferasa dando pie a AE-monometil

eter y AE-dimetil eter, mismos que pueden ser posteriormente conjugados con ácido glucorónico y dar pie al metil-AE-glucoronido, dimetil-AE-glucoronido y otros isómeros a nivel intestinal y sistémico o bien transformarse a urolitinas (A, B, C y D) y distribuirse en plasma, orina y heces para su excreción⁶¹⁻⁶³. El ácido gálico por su parte, es descarboxilado a pirogalol el cual a su vez produce una serie de compuestos derivados por deshidroxilación (eg. Catecol o resorcinol). Finalmente los TH intactos así como los metabolitos serán excretados en heces⁶⁴.

Propiedades funcionales para la salud de GT y ET. Los efectos a la salud de los TH (ET y GT) son más reconocidos que sus efectos antifisiológicos, cuando se les compara a los TC. Sin embargo, los efectos atribuidos a TH en específico y la de sus compuestos monoméricos no se han estudiado de forma diferencial. Para poder discriminar estos efectos, se realizó un estudio de búsqueda sistemática en diversas bases de datos (PubMed, Cochrane, ScienceDirect) y documentos de libre acceso (Google Scholar) sobre TH que permitiera dilucidar estas diferencias. Las búsquedas realizadas se realizaron usando como descriptores de búsqueda (DeCS/MeSH) las palabras "hydrolyzable tannin", "gallotanin", "ellagitannin", "gallic acid" y "ellagic acid", "Pentagalol-glucose", "Pentagalol-O-glucopiranos", "PGG", "tannic acid" asociados a las palabras "Health effect", "preventive health", "cancer", "diabetes", "inflammation" and "antiproliferative", limitado a estudios "in vitro", "in vivo", "rats", "mice", "humans"

Tabla III
Efectos a la salud de los elagitaninos (ET)

Estudio	ET (Dosis)	Resultado	Efecto	Ref
In vitro	TG-I, TG-II, Geraniina, Agrimonina y otros (3.13 – 12.5 mg)	(-) UFC	Bactericida	70
In vitro	Punicalagina, 1- α -galoilpunicalagina (25–50 μ M)	(+) Oxido nitroso (NO)	Vasodilatación	71
In vitro	ácido elágico (5 - 20 μ M)	(-) expresión de cPLA2 α , COX-2 y mPGEs-1	Antiinflamatorio	72
In vitro	Punicalagina (8 - 32 μ M)	Inhibe la oxidación de lipoproteínas de alta densidad (HDL)	(-) RCV	73
In vivo (ratones)	Punicalagina, punicalina y ácido elágico (13.6 y 34 mg/kg)	(-) IL-6, IL-1 y TNF α	Antiinflamatorio	74
In vivo (ratas)	Extracto de granada (250 mg/kg y 500 mg/kg)	(-) GS, TC, TG, LDL-C, VLDL-C	Hipoglicémico y antidislipidemia	75
In vivo (humanos)	Granada suplemento, ET (435 - 870 mg)	(-) TBARS, \downarrow peso	(-) RCV	76
In vivo (humanos)	Granada fresca (100gr/día)	(+) FRAP	(-) Daño oxidativo	77
In vivo (humanos)	ET y ácido elágico (650 mg)	(+) Fuerza isométrica	(+) Fuerza muscular	78

Ciclooxigenasa 2 (COX-2); elagitanino (ET), glucosa serica (GS), Interleucina (IL) 1 (IL-1), 6 (IL-6), Sintasa 1 de PGE asociada a membrana (mPGEs-1), fosfolipasa a2 citoplasmática (cPLA2 α), riesgo cardiovascular (RCV), colesterol total (TC) triglicéridos totales (TG), telimagrandina I (TG-I); telimagrandina II (TG-II), crecimiento bacteriano (UFC); inhibe o disminuye (-), aumenta o estimula (+)

Tabla IV
Efectos a la salud de los galotaninos (GT) en diversos sistemas

Estudio	GT (Dosis)	Resultado	Efecto	Ref
<i>In vitro</i>	PGG (0.1-30 μ M)	(-)TNF α	Antiinflamatorio	79
<i>In vitro</i>	GT (0-100 μ M)	(-) PARG	(-) muerte celular	80
<i>In vitro</i>	PGG (50-250 μ M)	(-)DNA polimerasa	(-) replicación celular	81
<i>In vitro</i>	GT (40-80 μ g/ml)	(-) NF- κ B	(-) transcripcion	82
<i>In vitro</i>	AGQ (62.5 μ g/ml)	(+) Caspasa 3	Apoptosis	83
<i>In vitro/ In vivo</i>	PGG (50 μ M)	(-) STAT 3, \uparrow P53	Supresión de tumor	84
<i>In vitro / In vivo</i>	PGG (20 mg /kg 40-80 mg IP)	(-) Ciclina 1, (+) caspasas	Apoptosis	85
<i>In vivo</i>	AG (50-500 μ M)	(+) Caspasa 3	Apoptosis	86
<i>In vivo</i>	AT (20 mg/ kg)	(-) PARP	(-) efrototoxicidad	87
<i>In vivo</i>	AG/FRGT (50mg/kg)	(-) 54.3% TAE, IL- 6	Anticancerígeno	88
<i>In vivo</i>	AG/FRGT (50mg/kg)	(-) células 4T1	Anticancerígeno, (-) metastasis	

Acido gálico (AG), ácido galoquínico (AGQ), acido tánico (AT), fracción rica en galotaninos de *Caesalpinia spinosa* (FRGT), galotaninos (GT), factor nuclear de cadenas ligeras kappa (NF- κ B:), intraperitoneal (IP), poli ADP ribosa polimerasa (PARP), penta galoil glucosa (PGG), transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT 3), factor necrosis tumoral alfa (TNF- α), tumores ascíticos de Ehrlich (TAE), inhibe o disminuye (-), aumenta o estimula (+)

y “cell”. Después de eliminar artículos coincidentes entre bases, se seleccionaron nueve estudios⁷⁰⁻⁷⁸ con evidencia contundente sobre los efectos diferenciales de ET y acido eláxico y diez⁷⁹⁻⁸⁸ sobre acido gálico, PGG o acido tánico.

Los TH tienen una significativa CAOx lo cual confiere protección frente a radicales libres a quien los consume. Los ET, en particular, han sido materia de estudios de casos y controles y ensayos *in vitro* en la búsqueda de evidencia sobre su capacidad funcional para el riesgo cardiovascular, capacidad vasodilatadora, antiinflamatoria, bactericida, hipolipidémica, hipoglicémica y mejoramiento de la fuerza muscular (Tabla III)⁷⁰⁻⁷⁸. En particular, los estudios *in vitro* han mostrado diversos mecanismos por los cuales se disminuye el RCV. Dichos mecanismos incluyen un aumento en las sustancias reguladoras de vasodilatación, reducción de peso, aumento en lipoproteínas de alta densidad, aumento en la actividad antioxidante en plasma así como la expresión de factores que disminuyen la respuesta inflamatoria. De igual manera, los resultados obtenidos *in vivo* por las investigaciones presentes muestran efectos positivos sobre diversos biomarcadores cardioprotectores. Sin embargo, como es el caso de otros CPF monoméricos, los mecanismos por los cuales los ET confieren estos beneficios continúan en estudio pero se atribuyen a priori a la CAOx de sus productos de hidrólisis y bioconversión, señalados en la sección anterior.

Por su parte, las diversas evaluaciones con GT proponen un efecto benéfico en la prevención y tratamiento de distintas formas de cáncer (Tabla IV)⁷⁹⁻⁸⁸. Los mecanismos descritos para los GT y su efecto anti-cancerígeno involucran la inhibición/activación

de diversos factores de transcripción y replicación, el aumento en proteínas de reparación del ADN, la síntesis de proteínas y biomoléculas proapoptóticas e inhibición del crecimiento tumoral. Dichos efectos han sido evaluados en su mayoría en sistemas *in vitro*, y los pocos estudios presentes *in vivo* se han realizado en sistemas murinos con extractos de AG formando parte de la alimentación o por inyección intraperitoneal.

Finalmente, es bien sabido que los diversos compuestos presentes en un alimento (no solo los TH) pueden presentar un efecto benéfico y actuar de manera sinérgica; por consiguiente contemplar las condiciones alimentarias y fisiológicas al momento de diseñar una intervención, proporcionará información valiosa referente al consumo de general y específico de TH y la prevención de enfermedades crónicas.

Conclusión

El contenido de TH en los alimentos es muy limitado (particularmente GT). Por ende la búsqueda de sus fuentes naturales y su correcta identificación y análisis juega un papel imprescindible en la definición de su potencial benéfico para la salud humana. Los solventes polares, bajas temperaturas así como atmósferas modificadas pueden mejorar la eficiencia en la obtención y preservación de GT y ET. A su vez la naturaleza del sistema digestivo puede condicionar la liberación de sus compuestos activos particularmente en estómago y colon. Las diversas actividades biológicas asociadas a los TH dependen en gran medida de su diversidad estructural ya que esto condiciona las interacciones que presente, su absorción, metabolismo y potencial bioactivo. Por esto, el comprender las características

que limitan o favorecen su liberación (y por ende su potencial en pro de la salud) es de vital importancia para la industria de alimentos de nutraceuticos y para el consumidor que desea prevenir o mejorar su salud.

Agradecimiento

Los autores expresan su gratitud por el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca escolar otorgada al primer autor y por el apoyo económico recibido del Dr. Gustavo González-Aguilar mediante el proyecto 179574 de Investigación Científica Básica 2012: “Nutri genómica e Interacciones Moleculares de fenoles y fibra dietaria del mango Ataulfo (*Mangifera indica L.*) en un sistema murino”, de donde deriva el presente artículo de revisión.

Referencias

1. Arapitsas, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry* 2012; 135 (3): 1708–1717.
2. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew. Chem. Int.* 2011; 50(3): 586 – 62
3. Abe, L.T., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *J Sci Food Agric.* 2012; 92(8): 1679-87.
4. Koponen, J.M., Happonen, A.M., Mattila, Törrönen, A.R. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in finland. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(4): 1612-9.
5. Zuiko, M.E., Witkowska, A.M., Waskiewicz, A., Sygnowska, E. Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in polish adult population. *Adv Med Sci.* 2012; 57(2):1-10.
6. Malomo, S.A., Eleyinmi, A.F., Fashakin, J.B. Chemical composition, rheological properties and bread making potentials of composite flours from breadfruit, breadnut and wheat. *Afr J Fodd Sci.* 2011; 5(7): 400-411.
7. Le Bourvellec, C. y Renard, C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012; 52(3): 213-48.
8. Vázquez-Flores, A.A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A., de la Rosa, L.A. Taninos hidrolizables y condensados: Naturaleza química, ventajas y desventajas de consumo. *Tecnociencia.* 2012; 6(2): 84-93
9. Khanbabaee, K. y van Ree, T. Tannins: Classification and definition. *Nat Prod Rep.* 2001; 18:641-649.
10. Jin, L., Wang, Y., Iwaasa, A.D., Xu, Z., Schellenberg, M.P., Zhang, Y.G., McAllister, T.A. Short Communication: Effect of condensed tannin on in vitro ruminal fermentation of purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent)–cool-season grass mixture. *Canadian Journal of Animal Science* 2013; 93(1): 155-158.
11. Larrosa, M., Tomás-Baberan, F.A., Espin, J.C. The dietary hydrolyzable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem.* 2012; 17:611-625.
12. Jourdes, M., Pouysegou, L., Quideau, S., Mattivi, F., Truchado, P., Tomas-Baberan, F.A. Hydrolyzable tannins, Gallotannins, ellagitannins and ellagic acid (Ch. 20), en: Handbook of analysis of active compounds in functional foods. Nolet LML, Toldrá F (Eds), Boca R, FL, USA.
13. Gil, M. I., Aguayo, E., y Kader, A. A. Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54(12), 4284-4296.
14. Youngmok, K., Brecht, J.K., Talcott, S. Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica L.*) following hot water immersion and controlled atmosphere storage. *Food Chemistry* 2007; 105(4):1327–1334.
15. Carn, F., Guyot, A., Baron, S., Perez, J., Buhler, E., Zanchi, D. Structural properties of colloidal complexes between condensed tannins and polysaccharide hyaluronan. *Biomacromolecules* 2012; 13 (3): 751–75.
16. Ferrer-Gallego, R., Gonzalez, R., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailon, M.T., de Freitas, V. Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and α -amylase and their relationship to astringency perception. *Food Chem.* 2012; 135(2): 651-8.
17. Obreque-Slier, E., Pena-Neira, A., Lopez-Solis, R. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *LWT-Food Sci Technol.* 2012; 45(1),88-93.
18. Ferreira, D., Coleman, C.M. Towards the synthesis of proanthocyanidins: half a century of innovation. *Planta Med.* 2011; 77(11): 1071-85.
19. Wang, Y., Zhang, H., Liang, H., Yuan, Q. Purification, antioxidant activity and protein precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food Chem.* 2013; 138(1): 437-43.
20. Binkley, R.C., Ziepfel, J.C., Himmeldirk, K.B. Anomeric selectivity in the synthesis of galloyl esters of D-glucose. *Carbohydr Res.* 2009; 344(2): 237-9.
21. Niemetz, R. y Gross, G.G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry.* 2005; 66(17): 2001-11.
22. Hemingway, R.W., Laks, P.E. Plant polyphenols: Synthesis, properties, significance. Houghton, MI: Plenum Press. 1992; 59: 1045.
23. Garro-Galvez, J. M., Riedl, B., Conner, A.H. Analytical Studies on Tara Tannins. *Holzforchung.* 1997; 51(3): 235-243.
24. Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 40(1):206-10.
25. Okuda, T, Ido, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules* 2011; 16: 2191-2217.
26. Karonen, M., Parker, J., Agrawall, A., Salminen, J.P. First evidence of hexameric and heptameric ellagitannins in plants detected by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Com Mass Spec.* 2010; 24: 3151-3156.
27. Juha-Pekka, S., Karonen, M., Sinkkonen, J. Chemical ecology of tannins. Recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure-activity patterns. *Chem Eur J.* 2011; 17(10): 2806 – 2816.
28. Motilva, M. J., Serra, A., y Macià, A. Analysis of food polyphenols by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A.* 2013; 1292: 66-82.
29. Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of applied phycology* 2004; 16(4): 291-296.
30. Noel, V.T. y Se-Kwon, K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental toxicology and pharmacology* 2011; 32(3): 325-335.
31. Target, N.M. y Arnold, T.M. Effects of secondary metabolites on digestion in marine herbivores. In: McClintock JB, Baker BJ, editors. Marine chemical ecology. Florida, USA: CRC Press. pp. 391–411.
32. Denzel, K. y Gross, G. Biosynthesis of gallotannins. *Planta* 1991; 184(2): 285-289.
33. Hervas, G. Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas; efecto sobre la fermentación en el rumen la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. *Tesis* 2001, Universidad de León.
34. Engels, C., Schieber, A. y Ganzle, M. Inhibitory Spectra and Modes of Antimicrobial Action of Gallotannins from Mango

- Kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(7): 2215–2223.
35. Mamaní, A., Filippone, M., Grellet, C., Welin, B., Castagnaro, A.P., Ricci, J.C. Pathogen-induced accumulation of an ellagitannin elicits plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* 2012; 25(11):1430-9.
 36. Loake, G. y Grant M. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 2007; 10(5): 466-472.
 37. Rangel, G., Castro, E., Beltran, E., Reyes, H. y García, E. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 2010; 12(2): 90–95.
 38. Hagerman, A.E. Fifty years of polyphenol-protein complexes. In: Cheyneir V, SamiManchado P, Quideau S (eds) *Recent advances in polyphenol research* 2012; 3: 71-91.
 39. Goldstein, J. y Swain, T. The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 1965; 4:185–192.
 40. Ozdal, T., Capanoglu, E., y Altay, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* 2013; 51(2), 954-970.
 41. Barbehenn, R. y Constabel, P. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 2011; 72(13): 1551–1565.
 42. Wall-Medrano A, López-Díaz JA. 2014. Alimentación saludable y funcional (Capítulo 1), En: González-Aguilar GA, Vallejo-Córdoba B, González-Córdova AF, García HS, Álvarez-Parrilla E (Eds). Los alimentos funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos. México: Trillas, Con los editores.
 43. Talcott, S. y Talcott, S. Caracterización por Espectroscopía de Masas y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del Mango (*Mangifera Indica* L.) después de una Hidrólisis Enzimática. Texas A&M University, Department of Nutrition and Food Science. *Reporte* 2009.
 44. Mueller-Harvey, I. Analysis of hydrolyzable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 2001; 91(1-2): 3-20.
 45. Poovarodom, S., Haruenkit, R., Vearasilp, S., Namiesnik, J., Cvikrova, M., Martincova, O., Ezra, A., Suhaj, M., Ruamsuke, P., Gorinstein, S. Comparative characterization of durian, mango and avocado. *International Journal of Food Science and Technology* 2010; 45(5): 921–929
 46. Dorta, E., Lobo, M.G. y Gonzales, M. Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *J Food Sci* 2012; 77(1): 80-8.
 47. Stalikas C. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J.Sep.Sci* 2007; 30(18): 3268 – 3295.
 48. Sáyo-Ayerdi, S., Moreno-Hernández, C., Montalvo-González, E., García-Magaña, M., Mata-Montes de Oca, M., Torres, J., 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.
 49. Sudjaroen, Y., Hull, W., Erben, W., Würtele, G., Changbumrung, S., Ulrich, C., Owen, R. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds. *Phytochemistry* 2012; 77: 226–237.
 50. FAO/IAEA. Quantification of Tannins in Tree Foliage. Documento de trabajo. 2000; 26.
 51. Salminen, J.P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J Chem Ecol.* 2004; 30(9):1693-711.
 52. Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50(7), 1785-1790.
 53. Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyo-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Álvarez-Parrilla, E. y González-Aguilar, G. A. Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function* 2014; 5(6): 1063-1072.
 54. Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M. y González-Aguilar, G. A. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function* 2014; 5(2): 189-197.
 55. Saura-Calixto, F., Serrano, J., y Goñi, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* 2007; 101(2): 492-501.
 56. Skopec, M. M., Hagerman, A. E., y Karasov, W. H. Do salivary proline-rich proteins counteract dietary hydrolyzable tannin in laboratory rats?. *Journal of chemical ecology* 2004; 30(9): 1679-1692.
 57. Soares, S., Mateus, N., y de Freitas, V. Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food Research International* 2012; 49(2): 807-813.
 58. Da Costa, G., Lamy, E., e Silva, F. C., Andersen, J., Baptista, E. S., y Coelho, A. V. Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. *Journal of chemical ecology* 2008; 34(3): 376-387.
 59. Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., y Tomás-Barberán, F. A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine* 2010; 31(6): 513-539.
 60. Krook, M. A., y Hagerman, A. E. Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International* 2012; 49(1): 112-116.
 61. Martínez-Malverde, I., Periago, M.J., Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN* 2000; 50(1): 5-18 .
 62. Cerdá, B., Llorach, R., Cerón, J.J., Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F.A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr.* 2003; 42(1):18-28.
 63. Griffiths, L.A. Y Barrow, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J.* 1972; 130(4): 1161-1162.
 64. González-Barrio, R., Truchado, P., García-Villalba, R., Hervás, G., Frutos, P., Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F. A. Metabolism of oak leaf ellagitannins and urolithin production in beef cattle. *Journal of agricultural and food chemistry* 2012; 60(12): 3068-3077.
 65. Amakura, Y., Okada, M., Sumiko, T., Tonogai, Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatogr A* 2000; 896(1-2):87–93.
 66. Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Crespy, V., Du Chaffaut, L., et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 2010; Article ID bap024, doi:10.1093/database/bap024
 67. Cornell University. Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules. Departamento de ciencia animal. 2013 <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>. Consultado en línea el 4 de Enero de 2013.
 68. USDA. Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. Agricultural Research Service. 2010
 69. Vatter, D.A. y Shetty, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem* 2003; 39(3): 367-379.
 70. Funatogawa, K., Hayashi, S., Shimomura, H., Yoshida, T., Hatanoto, T., Ito, H., Hirai, Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4): 251 – 261.
 71. Chen, L.G., Liu, Y.C., Hsieh, C.W., Liao, B.C., Wung, B.S. Tannin 1-a-O-galloylpunicalagin induces the calcium-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res* 2008; 52(10): 1162–1171.
 72. Karlsson, S. Studies of prostaglandin E2 formation in human monocytes. *Tesis*, 2010; Karlstad University Studies.
 73. Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M., Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutr.* 2012; 26(4): 359–366.
 74. Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., Haqqi, T.M. Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica*

- granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity *ex vivo* and IL-1beta-induced PGE₂ production in human chondrocytes *in vitro*. *Journal of inflammation* 2008; 5(9).
75. Bagri, P., Ali, M., Aeri, V., Bhowmik, M., Sultana, S. Antidiabetic effect of Punica granatum flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(1): 50–4.
 76. Hebers, D., Navindra, P., Seeram, H.W., Henning, S.M., Zhang, Y., Ogden, L.G., Dreher, M., Hill, J.O. Safety and Antioxidant Activity of a Pomegranate Ellagitannin-Enriched Polyphenol Dietary Supplement in Overweight Individuals with Increased Waist Size. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(24): 10050–10054.
 77. Hajimahmoodi, M., Oveisi, M.R., Sadeghi, N., Jannat, B., Nateghi, M. Antioxidant capacity of plasma after pomegranate intake in human volunteers. *Acta Med Iran* 2009; 47(2):125–32.
 78. Trombols, J.R., Barnes, J.N., Critchley, L., Coyle, E.F. Ellagitannins consumption improves strength recovery 2-3 d after eccentric exercise. *Official Journal of the American College of Sports Medicine* 2010; 42(3): 493-498.
 79. Kang, D. G., Moon, M. K., Choi, D. H., Lee, J. K., Kwon, T. O., & Lee, H. S. Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-β-D-glucose (PGG) via a nitric oxide-cGMP pathway. *European journal of pharmacology* 2005; 524(1-3): 111-119.
 80. Formentini, L., Arapistas, P., Pittelli, M., Jacomelli, M., Pitozzoli, V., Menichetti, S., Romani, A., Giovannelli, L., Moroni, F., Chiarugi, A. Mono-galloyl glucose derivatives are potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors and partially reduce PARP-1-dependent cell death. *British Journal of Pharmacology* 2008; 155(8): 1235–1249.
 81. Mizushina, Y., Zhang, J., Pugliese, A., Sung-Hoon, K., Lu, J. Anti-cancer gallotannin penta-O-galloyl-beta-D-glucose is a nanomolar inhibitor of select mammalian DNA polymerases. *Biochemical Pharmacology* 2010; 80(8): 1125–1132.
 82. Al-Halabi, R., Chedid, M. B., Merhi, R. A., El-Hajj, H., Zahr, H., Schneider-Stock, R. Bazarbachi A & Gali-Muhtasib, H. Gallotannin inhibits NFκB signaling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer Biology & Therapy* 2011; 12(1): 59-68.
 83. Castañeda, D.M., Pombo, L.M., Urueña, C.P., Hernandez, J.F., Fiorentin, S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *Complementary and Alternative Medicine* 2012; 10 :38.
 84. Hu, H., Hyo-Jeong, L., Cheng, J. Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-β-D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells *in vitro* and suppresses prostate xenograft tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2681-2691
 85. Chai, Y., Lee, H. J., Shaik, A. A., Nkhata, K., Xing, C., Zhang, J. Y. Lü, J. Penta-O-galloyl-β-D-glucose induces G1 arrest and DNA replicative S-phase arrest independently of P21 cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, P27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B and P53 in human breast cancer cells and is orally active against triple-negative xenograft growth. *Breast Cancer Research* 2010;12(5): 67.
 86. Bin-Chuan, Ji., Wu-Huei, H., Jing-Gung, C. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways *in vitro* and suppresses lung xenograft tumor growth *in vivo*. *J Agric Food Chem* 2009; 57(16):7596-604.
 87. Chanda, D. Anticancer activity, toxicity and pharmacokinetic profile of an indanone derivative. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47(5): 988-95.
 88. Urueña, C., Mancipe, J., Hernandez, J., Castañeda, D., Pombo, L., Gomez, A., Asea, A., Fiorentino, S. Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 3(1): 74.