

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE COLON *in vitro* PARA LA EVALUACIÓN DEL
METABOLISMO DE FLAVANOLES DE CACAO**

DIANA PATRICIA COLORADO MORA

VIDARIUM, CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN, SALUD Y BIENESTAR

Y

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTANCIAS BIOACTIVAS
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLIN

2017

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE COLON *in vitro* PARA LA EVALUACIÓN DEL
METABOLISMO DE FLAVANOLES DE CACAO**

DIANA PATRICIA COLORADO MORA

Tutora

KATALINA MUÑOZ, Ph.D

Comité tutorial

EDISON JAVIER OSORIO, Ph.D (Co-tutor).

RAFAEL ÁLVAREZ, Ph.D.

VIDARIUM, CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN, SALUD Y BIENESTAR

Y

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTANCIAS BIOACTIVAS

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACEUTICAS Y ALIMENTARIAS

FACULTAD DE QUIMICA FARMACEUTICA

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLIN

2017

Dedicado a

A mi padre, espero algún día ser la persona que ves cuando me miras

Y a JUAN ANDRÉS, la luz de mis ojos, la luz de mi alma.

Gracias por todo lo que me has enseñado.

Espero ser la madre que te mereces.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación en Nutrición, Salud y Bienestar- Vidarium del grupo empresarial Nutresa y al Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas de la Universidad de Antioquia por la financiación y apoyo logístico que permitió llevar al cabo este trabajo.

A la Compañía Nacional de Chocolates especialmente a los doctores Conrado Mora, Lucas Penagos Vélez, y Claudia Stella Velásquez.

Al comité tutorial por sus aportes, guía y la paciencia que me tuvieron durante este proceso.

A Kata por su apoyo y sabias palabras en los momentos más oscuros.

Al profesor Rafael por su constante ayuda en mi proceso de formación.

Al profesor Edison por permitirme ser parte del grupo.

A los compañeros de Vidarium: María Elena, Eliana, Vanessa, Juan Sebastián, Diego, Jacobo, Jelver.

A los compañeros del GISB, Anilla, Cami, Charlotte, Larus, Cata, Luisa, Luis, Nora, Karent, Kathy, Gio, Lorena, Marlon. Muy afortunada de tenerlos de compañeros; muchas gracias por las risas.

A mis amigos Eliana, Andrés, Eli, Gili, María, Carmencita y George por las risas y siempre estar presentes.

A mi familia, madre, mi otra madre Miryam, mi hermano, Paulina, Mariana, Yeny, Juan Pablo, Ana Isabel, Gabriela, Nata, JuanK, Jhon por estar siempre y darme impulso con solo recordarlos.

A mis hermanas, no de sangre, sino a las que encontré en el camino, Lili y Yudy... sin palabras, infinitas gracias.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Índice de figuras | 6 |
| Índice de tablas | 7 |
| Lista de abreviaturas | 8 |
| 1. Introducción | 9 |
| Compuestos fenólicos: generalidades y efectos en la salud | 9 |
| Metabolismo y catabolismo de los compuestos fenólicos | 13 |
| <i>Metabolismo colónico in vitro</i> | 18 |
| 2. Hipótesis..... | 26 |
| 3. Objetivos | 26 |
| Objetivo General: | 26 |
| Objetivos Específicos:..... | 27 |
| 4. Materiales y métodos | 28 |
| 4.1 Solventes y estándares..... | 28 |
| 4.2 Sujetos y obtención de las muestras de materia fecal..... | 28 |
| 4.3 Tratamiento de las muestras de materia fecal | 29 |
| 4.4 Validación del método para la cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina por HPLC-DAD..... | 30 |
| <i>Linealidad</i> | 30 |
| <i>Precisión:</i> | 31 |
| <i>Exactitud:</i> | 31 |
| <i>Límite de detección (LDD):</i> | 31 |
| <i>Límite de cuantificación (LDC):</i> | 32 |
| 4.5 Cuantificación de catabolitos de polifenoles generados por la microbiota mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS..... | 32 |
| 4.5.1 Preparación de las muestras de lodos fecales para la cuantificación de catabolitos del metabolismo microbiano por GC-MS..... | 33 |
| 4.5.2 Condiciones cromatográficas y adquisición de masas en modo Single Ion Monitoring (SIM) 34 | 34 |
| 4.6 Matriz alimentaria de cacao..... | 34 |
| 4.7 Análisis estadístico | 35 |
| 5. Resultados y Discusión | 36 |
| 6. Conclusiones..... | 60 |
| Referencias Bibliográficas | 62 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Clasificación de algunos compuestos fenólicos y su estructura básica. | 9 |
| Figura 2. Estructura básica de los flavonoides. | 10 |
| Figura 3. Subclases de flavonoides y representación estructural de los flavanoles monoméricos y poliméricos. | 11 |
| Figura 4. Sitios susceptibles a conjugación de los flavanoles. | 15 |
| Figura 5. Sitios de escisión del anillo C de los flavanoles. | 16 |
| Figura 6. Productos de la apertura de anillo de cianidina por la microbiota colónica. | 16 |
| Figura 7. Metabolismo propuesto de una procianidina trimérica por la microbiota del colón. | 24 |
| Figura 8. Esquema de toma de muestras en el ensayo de restricción dietaria. | 29 |
| Figura 9. Perfil cromatográfico (HPLC-FLD) de las procianidinas según su grado de polimerización en la alimentaria de cacao. | 35 |
| Figura 10. Fermentación de (+)-catequina por lodos fecales a través del tiempo. | 41 |
| Figura 11. Producción total de catabolitos detectados por GC-MS en lodos fecales. | 44 |
| Figura 12. Análisis de componentes principales y análisis discriminante de las muestras obtenidas de los 6 voluntarios en los 3 días del ensayo. | 45 |
| Figura 13. Análisis de componentes principales y discriminante de los lodos fecales. | 47 |
| Figura 14. Medias marginales estimadas de los 15 metabolitos detectados en el grupo de no consumidores de café. | 57 |
| Esquema 1. Ruta de biotransformación microbiana de procianidinas. | 50 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Metabolitos de componentes dietarios identificados en fluidos <i>in vivo</i> y en ensayos con microbiota <i>in vitro</i> . | 19 |
| Tabla 2. Catabolitos tipo ácido fenil propiónico (C6-C3), ácido acético (C6-C2), ácido benzoicos (C6-C1) y otros detectados en modelos de fermentación <i>in vitro</i> con microbiota intestinal humana. | 21 |
| Tabla 3. Características espectrales de los catabolitos fenólicos de interés mediante espectrometría de masas. | 33 |
| Tabla 4. Evaluación de linealidad de la función de calibración de los analitos (+)-catequina y (-)-epicatequina mediante HPLC-DAD. | 36 |
| Tabla 5. Evaluación del desempeño del método de cuantificación para (+)-catequina y (-)-epicatequina en lodos fecales mediante HPLC-DAD. | 37 |
| Tabla 6. Iones cuantificador e identificador, ecuación de regresión, coeficiente de determinación y factor de respuesta de las 20 moléculas de interés analizadas por GS-MS. | 39 |
| Tabla 7. Porcentaje de materia fecal y concentración de (+)-catequina utilizados en la fermentación y la concentración de (+)-catequina y porcentaje de degradación alcanzado a una hora de incubación. | 40 |
| Tabla 8. Tiempo de retención, masa del compuesto y los iones mayoritarios. | 43 |
| Tabla 9. Catabolitos de la fermentación en un modelo de colon <i>in vitro</i> bajo diferentes tratamientos. | 53 |
| Tabla 10. Concentraciones de catabolitos de las fermentaciones de lodo fecal con y sin sustratos. | 55 |

Lista de abreviaturas

BSTFA+TMCS: N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida con trimetilclorosilano

DP: Grado de polimerización

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

HDL: lipoproteína de alta densidad

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

HPLC-DAD: HPLC con detector de arreglo de yoduros

HPLC-FLD: HPLC con detector de fluorescencia

LDC: Límite de cuantificación

LDD: Límite de detección.

LDL: lipoproteína de baja densidad

ON: óxido nítrico

PCA: Análisis de componentes principales

PLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

RSD: Desviación estándar relativa.

SIM: Monitoreo de ión seleccionado

1. Introducción

Compuestos fenólicos: generalidades y efectos en la salud

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y hacen parte integral de la dieta humana y animal. Estos compuestos son de considerable importancia dado que su consumo está asociado con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, infarto, cáncer y otras enfermedades crónicas no transmisibles (Bravo 1998). Estructuralmente, los compuestos fenólicos están conformados por estructuras aromáticas con uno o varios sustituyentes hidroxilos, y comprenden desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos altamente polimerizados. A pesar de su diversidad estructural, este grupo de compuestos es frecuentemente referido como polifenoles. En las plantas, estos compuestos se encuentran como *O*-glucósidos o *C*-glucósidos. Los *O*-glucósidos presentan sustituciones de azúcar unidas a los grupos hidroxilo de las agliconas mientras que en los *C*-glucósidos los grupos azúcar están unidos a carbonos de la aglicona (Garcia-Salas et al. 2010). Los carbohidratos comúnmente unidos a los compuestos fenólicos son la ramnosa, glucosa, galactosa y arabinosa. De tal diversidad estructural resulta un amplio número de compuestos fenólicos, que pueden ser categorizados en varias clases. En la **Figura 1** se muestran algunas de las subclases de este tipo de compuestos.

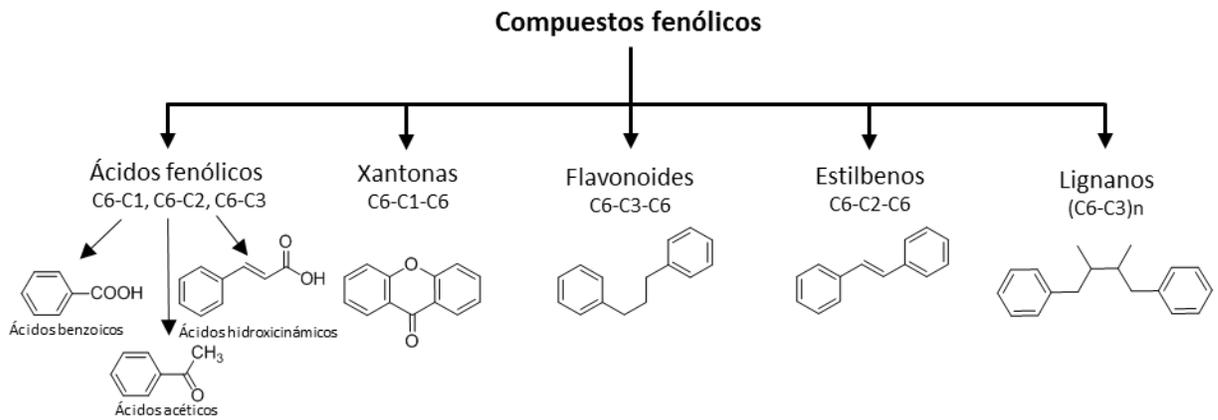


Figura 1. Clasificación de algunos compuestos fenólicos y su estructura básica

Los flavonoides son uno de los compuestos fenólicos más abundantes en los vegetales y frutas; son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de tres carbonos (**Figura 2**).

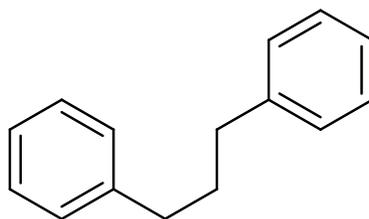


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales los flavonoides se subdividen en grupos de acuerdo a la saturación del anillo C y el estado de oxidación. Entre ellos se destacan los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianidinas (**Figura 3**). La clase más grande y ubicua de flavonoides monoméricos es la de los flavanoles caracterizados por poseer un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C. Estas moléculas comprenden las unidades constitutivas de las procianidinas o taninos condensados. Los dímeros de flavanoles con uniones C-4→C-8 o C-4→C-6 son llamados tipo B que incluyen: Procianidina B1 ((-)-epicatequina-(4β-8)-(+)-catequina), B2 ((-)-epicatequina-(4β-8)-(-)-epicatequina), B3 ((+)-catequina-(4α-8)-(+)-catequina), B4 ((+)-catequina-(4α-8)-(-)-epicatequina) y B5 que es un regioisómero de la procianidina B2 con unión interflavínica C-4→C-6. Las procianidinas tipo C son trímeros compuestos de 3 flavanoles unidos por dos uniones interflavínicas C-4→C-8. Otro tipo de dímeros son las procianidinas A, que poseen dos uniones una C-C y otra C-O. Algunas procianidinas de este tipo son A-1 ((-)-epicatequina-(2β→O-7; 4β-8)-(+)-catequina) y A-2 ((-)-epicatequina-(2β→O-7; 4β-8)-(-)-epicatequina) (Aron and Kennedy 2008). Las procianidinas son la mayor fracción del total de flavonoides ingeridos en la dieta de occidente, y el 74% de estas procianidinas ingeridas tienen grados de polimerización mayores de 3 (Gu et al. 2004).

Los mecanismos de acción a través de los cuales estos compuestos ejercen su actividad están asociados, entre otros a: acción hipolipemiante; reducción de la expresión de los receptores scavenger SR-A y CD36 en macrófagos cuando son estimulados con oxLDL (lipoproteína de baja densidad oxidada) o PMA (forbol miristato acetato); disminución de la captura de oxLDL (Kurowska and Manthey 2004) e inhibición en la expresión de genes y proteínas proinflamatorias inducido por elevados niveles de glucosa, incluyendo TNF- α , IL-1 β , y COX-2 (Wu et al. 2009). También se han asociado con actividad antiinflamatoria y antialérgica (Bellik et al. 2012). Sin embargo, los flavonoides también se caracterizan por presentar una baja absorción, tener una pobre biodisponibilidad y una alta tasa de depuración (Manach et al. 2005).

Una fuente importante de flavonoides en la dieta humana es el cacao y sus derivados. El principal grupo de polifenoles presente en el cacao es el de los flavanoles (**Figura 3**), que presentan estructuras monoméricas como (-)-epicatequina y (+)-catequina, y formas diméricas, oligoméricas y poliméricas con grados de polimerización mayores a diez. Estas formas poliméricas (procianidinas) representan el 58% de los flavonoides presentes en el cacao (Cooper et al. 2008; Ding et al. 2006; Wollgast and Anklam 2000). Diferentes propiedades y beneficios del consumo de chocolate y productos derivados del cacao han sido estudiados, enfocados principalmente al estudio de sus efectos antioxidantes, la protección cardiovascular y la actividad antitumoral (Rusconi and Conti 2010). En cuanto al efecto positivo en la salud cardiovascular, algunos estudios han mostrado que los polifenoles del cacao mejoran la función vascular por aumento de la vasodilatación del endotelio; incrementan el óxido nítrico (ON) por la activación de la óxido nítrico sintasa (Schroeter et al. 2006); disminuyen la presión arterial por mecanismos que involucran el incremento de ON y la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (Actis-Goretta, Ottaviani, and Fraga 2006) y disminuyen la adhesión plaquetaria, entre otros (Hermann et al. 2006).

El consumo de chocolate con alto contenido de procianidinas, ha mostrado una disminución significativa de los niveles de leucotrienos y un incremento de los niveles de prostaciclina lo que disminuye la activación plaquetaria, mejorando síntomas en enfermedades cardíacas y pulmonares (Schramm et al. 2001). Adicionalmente, diferentes trabajos han evidenciado que el consumo de chocolate disminuye la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y aumenta

los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL). Wan y colaboradores establecieron que el consumo de chocolate oscuro por cuatro semanas aumenta el retardo en la oxidación de LDL, la capacidad antioxidante en suero y los niveles de colesterol HDL (Wan et al. 2001).

Sin embargo, los efectos benéficos de los compuestos fenólicos en la salud de los seres humanos, solo se logran si éstos o sus metabolitos son absorbidos y alcanzan los tejidos diana en las concentraciones requeridas para que tengan un efecto biológico. Diferentes estudios realizados en humanos, han mostrado que son los compuestos de menor peso molecular los que alcanzan mayor concentración plasmática y por lo tanto, son los que pueden alcanzar el blanco terapéutico (Cooper et al. 2008; Corti et al. 2009). Por el contrario, las moléculas más grandes tienen baja probabilidad de atravesar la barrera intestinal sin haber sido previamente hidrolizados por la microbiota. Por esto, los compuestos tipo procianidina deben ser catabolizados en productos de menor peso molecular durante su tránsito por el colon, para que de esta manera puedan ser absorbidos y utilizados por el organismo (Cooper et al. 2008). Hay evidencia de que el metabolismo colónico es fundamental para aumentar la biodisponibilidad de las procianidinas, ya que el colon puede ser considerado como un biorreactor, en el que su gran contenido de bacterias permite la degradación de los componentes de la dieta que llegan a éste (Németh et al. 2003; Tilgmann and Ulmanen 1996). Un ejemplo concreto de esto son las isoflavonas de soya, en cuyo caso, la efectividad clínica se debe a que son transformadas por la microbiota colónica en un potente metabolito estrogénico, el equol. Es de notar que solo una tercera parte de la población puede transformar las isoflavonas en equol, demostrando las diferencias que existen entre los individuos en el catabolismo de la flora bacteriana del colon sobre los compuestos fenólicos (Yuan, Wang, and Liu 2007). La biodisponibilidad de cada uno de los compuestos fenólicos es muy variada y algunos pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal humano, los no absorbidos podrían exhibir un efecto antioxidante de manera local hasta el momento en que sean excretados (Saura-Calixto 2012). Además, la microbiota juega un papel importante en la hidrólisis enzimática de la porción glucídica mediante glicosidasas bacterianas antes de la absorción (Morris et al. 2002).

Metabolismo y catabolismo de los compuestos fenólicos

Los flavonoides pueden sufrir varias modificaciones que aumentan las posibilidades de absorción y su actividad biológica. Estas modificaciones pueden deberse además de factores sistémicos, como

lo que ocurre en el hígado u otros órganos y tejidos, a factores intestinales. Cuando un alimento es consumido, sufre numerosas modificaciones desde el comienzo de su recorrido por el tracto gastrointestinal humano. En la cavidad oral, además del proceso de masticación donde el alimento es desintegrado para ayudar en la liberación de los compuestos que lo conforman, sufre modificaciones químicas, todo esto buscando que los nutrientes que se encuentran en la matriz alimentaria sean liberados para aumentar la eficiencia de la absorción. Algunos de estos flavonoides se encuentran como glicósidos y pueden ser desglucosidados por la microbiota de la boca o por células epiteliales (Walle et al. 2005). Al llegar al estómago, la acidez del jugo gástrico disminuye el tamaño del bolo alimenticio con un aumento en la liberación de flavonoides de la matriz alimentaria (Scalbert and Williamson 2000). Un tipo de compuestos fenólicos, los ácidos cafeíco y ferúlico como agliconas, son absorbidos en el estómago, pero en general es muy pobre la absorción de compuestos fenólicos en esta cavidad. El bolo alimenticio y flavonoides que no han sido absorbidos hasta este punto, continuarán su recorrido por el tracto gastrointestinal. Durante su tránsito por el intestino, algunos glicósidos serán absorbidos a través de transportadores de azúcar de las células epiteliales, y dentro de estas, serán hidrolizados por β -glucosidasas, formándose la aglicona después de ser absorbidas. Sin embargo, las agliconas de los flavonoides también pueden ser formadas en la luz del tracto gastrointestinal, por la lactasa floricina hidrolasa (LPH), una β -glucosidasa que se encuentra unida a la membrana del epitelio (Day et al. 2000; Németh et al. 2003).

Una vez absorbidas, las agliconas y ácidos fenólicos sufren conjugación en el epitelio del íleon o en algunos órganos. Los flavanoles que son absorbidos en el intestino sufren conjugaciones con el fin de convertirlos en compuestos que fácilmente puedan ser eliminados por vías urinarias o biliares gracias al aumento de solubilidad y peso molecular. Una de las enzimas involucrada en estos procesos es la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT) que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la adenosin metionina a polifenoles que contengan un grupo difenólico. Esta enzima se encuentra en varios tejidos pero su actividad es mayor en hígado y riñones (Tilgmann and Ulmanen 1996). La sulfotransferasa (SULT) cataliza la transferencia de un grupo sulfato de la fosfoadenosina fosfosulfato a un grupo hidroxilo de varios sustratos incluyendo los polifenoles, esta reacción ocurre principalmente en el hígado (Falany 1997). La Uridina-difosfato glucuronosil transferasa (UGT) enzima que se encuentra en el retículo endoplasmático de numerosos órganos, cataliza la transferencia de ácido glucurónico proveniente de UDP-ácido glucurónico a compuestos

fénolicos (Boersma et al. 2002). En la **Figura 4** se muestran los sitios más susceptibles a conjugaciones de un flavanol (Archivio et al. 2010). Estos compuestos conjugados pueden salir del hígado nuevamente hacia la luz intestinal en la bilis (circulación entero-hepática) (Donovan et al. 1999; Natsume et al. 2003; Felgines et al. 2003). Es importante tener presente que los mecanismos de conjugación son extremadamente eficientes por lo que se encuentran agliconas sin modificar en la corriente sanguínea en muy poca cantidad. Además de los cambios estructurales que sufren los compuestos fenólicos en algunos órganos después de su absorción, también sufren modificaciones durante su tránsito por el intestino. Gran cantidad de estos compuestos ingeridos no es absorbida en la parte superior del tracto gastrointestinal, por lo que llegan al colon intactos para sufrir posteriormente transformaciones propias del catabolismo colónico de los compuestos fenólicos.

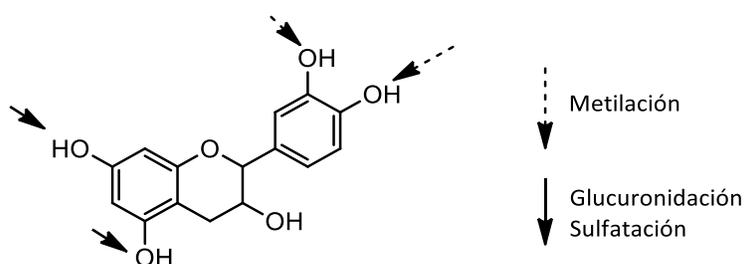


Figura 4. Sitios susceptibles a conjugación de los flavanoles

El colón por mucho tiempo fue considerado como un sitio de paso donde los componentes de los alimentos que no fueron absorbidos esperaban a ser excretados; ahora se reconoce su gran importancia en el metabolismo considerándolo un bioreactor, en el que su gran contenido de bacterias permite la degradación de los componentes de la dieta que llegan a éste. El colón tiene una enorme cantidad de bacterias anaerobias obligadas y facultativas, alrededor de 10^{12} por gramo de materia fecal, y estas tienen funciones tan importantes como obtener por fermentación energía de los carbohidratos que no fueron absorbidos en el intestino delgado, la producción de vitaminas B y K y el metabolismo de xenobióticos como los compuestos fenólicos (Kleessen, Bezirtzoglou, and Matto 2000; Salminen et al. 1998). Estas bacterias colónicas pueden hidrolizar glicósidos, glucurónidos, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas. También realizan reacciones de reducción, descarboxilación, demetilación, dehidroxilación y de fisión de anillo (A.-M. Aura 2008). Esta última modificación es muy importante, en ella el anillo C de los flavonoides sufre una fisión

(Selma, Espín, and Tomás-Barberán 2009) (**Figura 5**) y por esta reacción se forman a partir del anillo A y B, compuestos aromáticos y ácidos fenólicos, respectivamente.

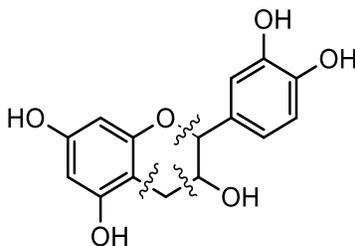


Figura 5. Sitios de escisión del anillo C de los flavanoles.

Por ejemplo, en el catabolismo colónico de la cianidina (**Figura 6**) sucede deconjugación y apertura del anillo C, a partir del anillo A se produce acetaldehído 2-(2,4,6- trihidroxifenil) y del anillo B ácido 3,4-dihidroxi benzoico (A.-M. Aura 2008; Vitaglione et al. 2007). En estructuras más complejas, como los trímeros de procianidina (**Figura 3**), también hay transformaciones por la microbiota del colon humano, produciendo compuestos fenólicos derivados de ácidos fenilvalérico, fenilpropiónico, fenilacético y benzoico con diferentes patrones de hidroxilación, dependiendo del grado de polimerización de los flavonoles (RR 1970; Déprez et al. 2000).

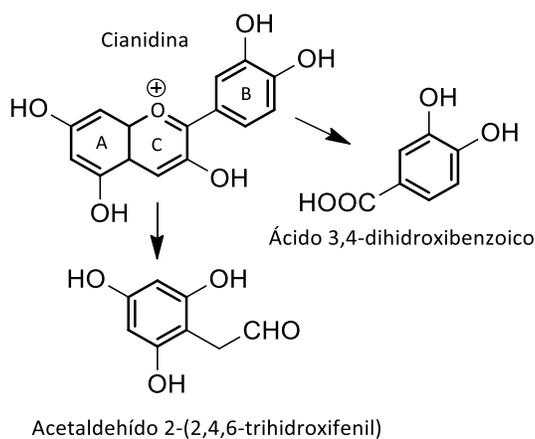


Figura 6. Productos de la apertura de anillo de la cianidina por la microbiota colónica

Se calcula que entre el 90 y 95% de los flavonoides ingeridos en la dieta llegan al colon intactos (Clifford 2004), donde sufren desglicosilación o deconjugación formando agliconas, gracias a la acción de enzimas microbianas como α -ramnosidasa, β -glucosidasa y β -glucuronidasa. La

deconjugación por las enzimas de la microbiota del colon es importante, ya que existe evidencia que el metabolismo microbiano de compuestos fenólicos puede ocurrir solo después de la deconjugación (Falany 1997) y los compuestos que no son deglicosilados son excretados y encontrados en las heces sin ninguna modificación. Así, durante su tránsito por el colon, se forman catabolitos microbianos de los flavonoides, los que provienen de apertura de anillos y varias reacciones de eliminación de grupos funcionales (deshidroxilación, desmetilación y descarboxilación).

Se han realizado diferentes estudios de intervención que demuestran la diversidad de metabolitos después del consumo de una dieta rica en compuestos fenólicos. Estos incluyen conjugados hepáticos y productos de degradación microbianos. En la **Tabla 1** se listan algunos de los metabolitos y catabolitos producidos *in vivo* e *in vitro* derivados de varios tipos de flavonoides y los fluidos en los que han sido encontrados y van desde compuestos tipo ácidos propiónicos a compuestos más pequeños como ácidos benzoicos. La diferencia principal entre los metabolitos encontrados en los modelos *in vivo* e *in vitro* es que en los modelos *in vivo* se detectan principalmente metabolitos que fueron metilados después de la absorción intestinal. Ante las dificultades y demoras de los estudios de intervención en humanos para evaluar la biodisponibilidad de nutrientes, se han generado modelos de digestión *in vitro* que asemejan gran parte o porciones del tracto gastrointestinal humano (Macfarlane and Macfarlane 2007; Zihler Berner et al. 2013; Jiménez-Vera et al. 2008; Testing, n.d.; Vardakou et al. 2007). Estos modelos simulan las condiciones y reacciones que ocurren en la boca, estómago, duodeno, íleon y colon. Los modelos *in vitro* de la parte superior del intestino son usados para remover los componentes digeribles y para la detección de cambios en los no digeribles. Los modelos de colon *in vitro* buscan elucidar el rol de la microbiota en el metabolismo de todas las partes no digeribles de la dieta, fibra dietaria y componentes fenólicos especialmente (Anna-marja Aura 2005; Valenzuela 2007) y estos ha sido útiles en el entendimiento de los procesos que sufren los compuestos ingeridos en la dieta y su uso se justifica para evaluar el metabolismo de sustancias en matrices complejas como vinos, fibra dietaria, verduras y extractos de frutas entre otros (Garcia-Salas et al. 2010; Aron and Kennedy 2008; Gu et al. 2004; Martínez-Flórez et al. 2002).

Metabolismo colónico in vitro

Una forma de estudiar el metabolismo colónico de una manera no invasiva, es a través del establecimiento de un modelo de colon *in vitro* para lo que se requiere la microbiota colónica mediante la recolección de materia fecal de voluntarios sanos. En las heces se detectan mediante cultivo grandes cantidades de bacterias anaerobias obligadas, como *Bacteroides spp.*, *Eubacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, Clostridios, lactobacilos, cocos anaerobios y *Fusobacterium spp.* También son comúnmente encontrados organismos anaerobios facultativos tales como *Escherichia coli*, enterococos y estreptococos (Cooper et al. 2008; Rusconi and Conti 2010).

La implementación de modelos de colon *in vitro* en pequeña escala y sin necesidad de intervenciones complejas, ha permitido un mejor entendimiento de los procesos metabólicos que sufren los compuestos de interés que son vehiculizados en la dieta (A.-M. Aura 2008). Para el establecimiento de modelos de colon *in vitro* se han creado protocolos utilizando sistemas continuos en los que se simulan las condiciones de varios compartimientos del intestino; semi-continuos, donde se simula de la región proximal a la porción distal del colón y discontinuos en los que se tiene un solo fermentador con condiciones fijas. Estos métodos difieren entre sí en la estructura de los fermentadores, relación de sustrato-inóculo, medios, condiciones de funcionamiento y de muestreo que se pueden utilizar para fines específicos (Bravo 1998; Salminen et al. 1998; Yuan, Wang, and Liu 2007). Por ejemplo, los cultivos discontinuos son adecuados para los estudios de metabolismo microbiano de compuestos fenólicos aislados, ya que solo se quiere conocer los productos del metabolismo de compuestos que no están inmersos en una matriz alimentaria, por ello, este método es el más adecuado para evaluar el metabolismo de flavanoles aislados (Rusconi and Conti 2010; Schramm et al. 2001; Wan et al. 2001). Los estudios que utilizan el modelo de colon *in vitro* plantean que la variación individual de muestras fecales es causada por la edad o la dieta del donante al momento de la colección de las heces, por enfermedades intestinales o por el uso de medicamentos, especialmente antibióticos (Cooper et al. 2008; Corti et al. 2009; Kleessen, Bezirtzoglou, and Matto 2000). En un estudio realizado por Rechner *et al.*, las diferencias entre 4 sujetos de estudio fueron marcadas en cuanto al perfil de metabolitos luego de la fermentación *in vitro* de ácido clorogénico, naringenina y rutina con materia fecal (Rechner et al. 2004). Por lo tanto, se propone que la actividad metabólica se puede estabilizar mediante la diversificación de la composición microbiana utilizando una mezcla de materia fecal de varios individuos (Weaver et al. 1989).

Tabla 1. Metabolitos de componentes dietarios identificados en fluidos *in vivo* y en ensayos con microbiota *in vitro*

| Precusores fenólicos | Metabolitos <i>in vivo</i> | Metabolitos <i>in vitro</i> |
|--------------------------------|---|---|
| Flavonoles | | |
| Quercetina | Ácido 2-(3,4- dihidroxifenil) acético (A) (M. Gross et al. 1996) Ácido 2-(3-hidroxifenil) acético (B) 3,4-dihidroxitolueno (B) Ácido 2-(3-Metoxi-4-hidroxifenil) acético (B) (Cervantes-Laurean et al. 2006) | Ácido 2-(3,4- dihidroxifenil) acético Ácido 2-(3- hidroxifenil) acético (C) (A Aura et al. 2002) |
| Miricetina | Ácido 2-(3,5- Dihidroxifenil) acético (D) Ácido 2-(3- hidroxifenil) acético (D) (Griffiths and Smith 1972) | Ácido 2-(3, 4, 5-trihydroxyphenyl) acético Ácido 2-(3,5- dihidroxifenil) acético Ácido 2-(3- hidroxifenil) acético (E) (Griffiths and Smith 1972) |
| Flavanoles | | |
| (+)-Catequina | 3-(3- hidroxifenil) Ácido propiónico 5- δ -(3,4- Dihidroxifenil)- γ -valerolactona (A y F) (Das and Sothy 1971) | Ácido 3-(3, 4- dihidroxifenil) propiónico Ácido 3-(3- hidroxifenil) propiónico Ácido 3-fenil propiónico (C)(A.-M. Aura 2008) Ácido 5-(3,4- dihidroxifenil)-valérico Ácido 5-(3- hidroxifenil)-valérico (G) (RR 1970) Ácido 5-(3,4- dihidroxifenil)-valérico (C) (A.-M. Aura 2008) |
| (-)-Epigallocatequin galato | (-)-5-(3',4',5'-Trihidroxifenil)- γ - valerolactona (-)-5-(3',4'- Dihidroxifenil)- γ - valerolactona (-)-5-(3',5'- Dihidroxifenil)- γ -valerolactona (A) (Meng et al. 2002) | Ácido Gallico, pirogallol (-)-Epicatequina (-)-5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ - valerolactona (-)-5-(3',5'- dihidroxifenil)- γ -valerolactona Ácido 5-(3,4- dihidroxifenil) valérico Ácido 5-(3-hidroxifenil) valérico Ácido 3-(3,4- dihidroxifenil) propiónico Ácido 3-(3- hidroxifenil) propiónico (C) (Meselhy, Nakamura, and M. 1997) |
| Antocianidinas | | |
| Cianidina glucosidos | Ácido 3,4-dihidroxi benzoico (A y F) (Vitaglione et al. 2007) | Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (C) (A.-M. Aura et al. 2005) |
| Ácidos hidroxicinámicos | | |
| Derivados del ácido cafeico | Ácido Ferulico (D) (M. P. Gonthier et al. 2003) Ácido 3-(3,4- dihidroxifenil) propiónico Ácido 3-(3- hidroxifenil) propiónico Ácido 3-hidroxi benzoico Ácido 3-hidroxi hipúrico Ácido hipúrico (A y H) (Olthof et al. 2003) | Ácido 3-(3 - hidroxifenil) propiónico Ácido benzoico (C) (M-P Gonthier et al. 2006) 4-Etilcatecol (C) (Peppercorn and Goldman 1971) |
| Procianidinas | | |
| Procianidinas | Ácido 2-(3,4- dihidroxifenil) acético Ácido 3-(3- hidroxifenil) propiónico Ácido 2-(3- hidroxifenil) acético Ácido ferúlico | Procianidinas Ácido 3-(3 - hidroxifenil) propiónico Ácido 2-(4- hidroxifenil) acético Ácido 3-(4 - hidroxifenil) propiónico |

| Precusores fenólicos | Metabolitos <i>in vivo</i> | Metabolitos <i>in vitro</i> |
|----------------------|--|---|
| | Ácido 2-(3-metoxi-4- hidroxifenil) acético Ácido 3-hidroxi benzoico (A) (Rios et al. 2003) Ácido 5-(3,4- dihidroxifenil) valérico Ácido 5-(3- hidroxifenil) valérico Ácido 3-(3,4- dihidroxifenil) propiónico Ácido 3-(3- hidroxifenil) propiónico Ácido 3,4-dihidroxibenzoico Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico Ácido 4-hidroxibenzoico (D) (Marie-Paule Gonthier et al. 2003) | Ácido 3-(3- hidroxifenil) acético Ácido 3 Fenilpropionico (C) (Déprez et al. 2000) |

A: orina humana; B: suero humano; C: microbiota fecal humana; D: orina de rata; F: heces humanas; E: microbiota fecal rata; G: microbiota fecal conejo; H: plasma humano.

Los modelos de colon *in vitro* son una herramienta que posibilita evaluar de manera rápida diferentes compuestos y matrices alimentarias; estos modelos permiten dilucidar los componentes que pueden ser absorbidos luego del metabolismo colónico, así como entender su biodisponibilidad y determinar lo que debe ser evaluado *in vivo*. Estudios anteriores que evaluaron sustratos ricos en polifenoles o flavonoides puros, detectaron la aparición o aumento de catabolitos tipo ácido propiónico (C6-C3), ácido acético (C6-C2) y ácido benzoico (C6-C1) principalmente. En la **Tabla 2** se referencian algunos trabajos que han usado el modelo de colon *in vitro*, así como las condiciones utilizadas para el establecimiento del modelo, en los cuales se lograron detectar metabolitos de catabolismo microbiano. La formación de estos catabolitos se basa en el mecanismo previamente descrito, que inicia con la fisión del anillo C y las posteriores deshidroxilaciones, y β y α oxidaciones, para formar moléculas cada vez más pequeñas que las antecesoras (Mosele et al. 2014).

Tabla 2. Catabolitos tipo ácido fenil propiónico (C6-C3), ácido acético (C6-C2), ácido benzoicos (C6-C1) y otros detectados en modelos de fermentación *in vitro* con microbiota intestinal humana.

| Catabolitos | Sustrato | Inóculo-condiciones | Referencia |
|---|---|--|------------------------|
| C6-C3 Ácido 3-fenil propiónico, ácido 4-hidroxi fenil propiónico, ácido 3-hidroxi fenil propiónico, ácido 3,4-dihidroxi fenil propiónico | Vino, extracto de té negro y extracto de jugo de Uva a 500 y 1000 mg/mL | 10 donantes, inóculo 0.5% en Buffer fosfato más agentes reductores. Incubación con agitación por 72 horas a 37°C con flujo de N ₂ | (G. Gross et al. 2010) |
| C6-C2 Ácido 3-hidroxi fenil acético | | | |
| C6-C1 Ácido benzoico | | | |
| Otros Ácido vanílico | | | |
| C6-C3 Ácido dihidrocafeico a partir de ácido cafeico por reducción del doble enlace. ácido 3-hidroxi fenil propiónico, ácido 4-hidroxi fenil propiónico, ácido 3-fenil propiónico, ácido 3,4-dihidroxi fenil propiónico | Ácido clorogénico, naringina y rutina entre 125 y 2000 mg/mL | 6 donantes, inóculo 10% con medio de crecimiento, pH 7. Incubación independiente por 48 horas 37°C en baño maría con agitación. Flujo continuo de nitrógeno libre de O ₂ (15 mL/min). | (Rechner et al. 2004) |
| C6-C2 Ácido 3-hidroxi fenil acético, ácido 3,4-dihidroxi fenil acético (producto de rutina) | | | |
| C6-C3 Ácido 3-hidroxi fenil propiónico | 500 µM de tirosol, hidroxitirosol, hidroxitirosol acetato u oleuropeina de aceite de oliva. | 3 donantes, inóculo al 5% con buffer fosfato (0.11M carbonate-0.02 M fosfato pH 7) 37°C, agitación por 48 horas. | (Mosele et al. 2014) |
| C6-C2 Ácido 4-hidroxi fenil acético, ácido 3,4-dihidroxi fenil acético, ácido fenil acético | | | |

| Catabolitos | Sustrato | Inóculo-condiciones | Referencia |
|---|---|---|--------------------------------------|
| C6-C3 Ácido 3-hidroxi fenil propiónico, ácido 3,4-dihidroxi fenil propiónico, ácido 4-hidroxi fenil propiónico, ácido fenil propiónico. | Extracto de vino 0,6 mg/mL (monómeros y dímeros de flavanoles principalmente) | 3 donantes, medio de cultivo a pH 7, 1% de inóculo incubados a 37°C con agitación por 48 horas. | (Sánchez-Patán et al. 2012) |
| C6-C2 Ácido 4-hidroxi fenil acético, ácido 3-hidroxi fenil acético, ácido 3,4-dihidroxi fenil acético, ácido fenil acético | | | |
| C6-C1 Ácido benzoico | | | |
| Otros Catecol | | | |
| C6-C3 Ácido 3-hidroxi fenil propiónico, ácido 3,4-dihidroxi fenil propiónico, ácido 4-hidroxi fenil propiónico, ácido fenil propiónico | Ácido clorogénico, cafeico, rutina y quercetina a 10, 30 y 100 µg/mL. | Medio de cultivo en condiciones anaeróbicas. | (Parker, Trower, and Stevenson 2013) |
| C6-C2 Ácido 3-hidroxi fenil acético | | | |
| Otros Ácido hidrocafeico | | | |
| C6-C3 Ácido 3-hidroxi fenil propiónico, | | | |
| C6-C2 Ácido 3-hidroxi fenil acético | Fracción de cacao insoluble en agua 1% peso/volumen. | 1 donante, 3 fermentadores a pH 5.5, 6.2 y 6.8 a 37°C con 20% de inóculo en PBS, 3 días. | (Fogliano et al. 2011) |
| C6-C1 Ácido 3,4 dihidroxi benzoico | | | |

| Catabolitos | Sustrato | Inóculo-condiciones | Referencia |
|--|--|---|----------------------------|
| C6-C3 Ácido 4-hidroxi fenil propiónico, ácido 3,4-dihidroxi fenil propiónico | | | |
| C6-2 Ácido 4-hidroxi fenil acético, ácido 3-hidroxi fenil acético ácido 3,4-dihidroxi fenil acético | Mezcla de vino rojo y extracto de jugo de uvas y extracto de té negro. | TWINSHIME | (Dorsten et al. 2012) |
| C6-C1 Ácido 3-hidroxi benzoico, ácido 4 hidroxi benzoico, ácido 3,4 dihidroxi benzoico. | | | |
| Otros Ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido siringico. | | | |
| C6-C3 Ácido 3-hidroxi fenil propiónico | Ácido cafeico, clorogénico y caftarico 1 µmol. | 4 donantes, inóculo al 5%, pH 5.5, 37°C con agitación en condiciones de anaerobiosis por 24 horas. | (M-P Gonthier et al. 2006) |
| C6-C1 Ácido benzoico | | | |
| C6-C3 Ácido 3,4-dihidroxi fenil propiónico, ácido fenil propiónico. 4-hidroxi fenil propiónico. | | | |
| C6-C2 Ácido 3,4-dihidroxi fenil acético, ácido 3-hidroxi fenil acético. | Uva sirah liofilizada o vino 100 mg/10ml, extracto de Procianidinas 25 mg/ 10 mL | 4 donantes, inóculo al 10% con buffer fosfato (0.11M carbonate-0.02 M fosfato pH 5.5) 37°C, 250 rpm por 24 horas. | (A.-M. Aura et al. 2012) |
| C6-C1 Ácido 3,4 dihidroxi benzoico, ácido 3,5-dimetoxi-4-dihidroxi benzoico | | | |
| Otros Ácido vanílico | | | |

En el caso concreto del cacao, la mayor cantidad de flavanoles se encuentran como polímeros (con diversos grados de polimerización), moléculas de gran tamaño que no pueden atravesar la barrera intestinal sin antes ser transformadas por la microflora residente. Por lo tanto, los compuestos tipo procianidina deben ser metabolizados en productos de menor peso molecular durante su tránsito por el colon, para que de esta manera puedan ser absorbidos y utilizados por el organismo (Cooper et al. 2008). Por lo tanto el metabolismo colónico es fundamental para aumentar la biodisponibilidad a partir del catabolismo de las procianidinas (**Figura 7**) (Manach et al. 2005; Cooper et al. 2008). Adicionalmente, se ha demostrado en pruebas *in vitro* que los catabolitos colónicos tienen efectos en la modulación del sistema inmune, poseen efectos antiinflamatorios y actividad antioxidante. Concretamente, los ácidos 3,4-dihidroxifenilpropionico, 3-hidroxifenilpropionico, 3,4-dihidroxifenil acético, 3-hidroxifenil acético y 4-hidroxibenzoico inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con lipopolisacárido (María Monagas et al. 2009). Los ácidos 3,4-dihidroxifenil acético, 4-hidroxifenil acético y 3-hidroxifenil acético presentaron actividad antioxidante evaluada por DPPH (Glässer et al. 2002).

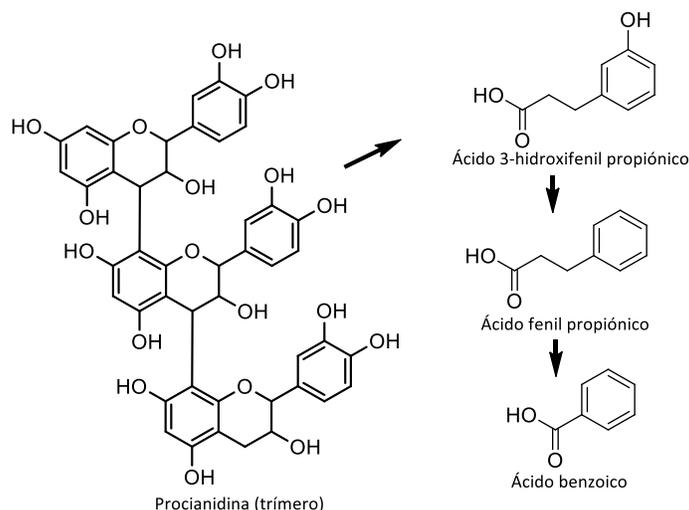


Figura 7. Metabolismo propuesto de una procianidina trimérica por la microbiota del colon

Para que un alimento tenga efectos deseados en la salud humana, además de contener nutrientes y compuestos bioactivos, estos deben ser absorbidos y utilizados por el organismo, es decir que deben ser biodisponibles. Por lo tanto, la estructura química de las sustancias, así como el efecto

de la matriz alimentaria, son consideraciones importantes al momento de plantear estudios que busquen establecer beneficios en salud a partir de la alimentación. En la actualidad, no es posible conocer el perfil biocinético de todos los compuestos bioactivos presentes en los alimentos. El chocolate y otros productos derivados del cacao contienen cantidades altas de flavanoles, los cuales han sido reconocidos como seguros y benéficos para la salud cardiovascular por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA 2012). En el caso de los flavanoles se dispone de información parcial respecto a sus perfiles de absorción gástrica. Sin embargo, existen fracciones polifenólicas presentes en las matrices originarias del cacao que no son absorbidas y que los estudios convencionales no explican completamente. La biodisponibilidad de los flavanoles se ve afectada por las características intrínsecas de los individuos y factores extrínsecos como el peso molecular de los compuestos y su estructura química, los cuales son determinantes en los procesos de absorción. Los monómeros catequina y epicatequina, alcanzan concentraciones plasmáticas del orden micromolar, en contraste con los dímeros de estas moléculas que solo logran concentraciones nanomolares; por su parte las procianidinas con mayor grado de polimerización no son absorbidas como tal (Holt et al. 2002).

En la actualidad existe gran interés en contar con alimentos que pueden beneficiar la salud y disminuir el riesgo de sufrir enfermedades. En los últimos años se ha demostrado una relación entre el consumo de los alimentos derivados del cacao y la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, lo cual podría tener gran impacto en salud pública toda vez que son productos de amplio consumo en el mundo (Latif 2013). Además de los efectos reportados para la salud cardiovascular, recientemente se ha reportado que el consumo de chocolate previene en ratas el desarrollo de obesidad, disminuye la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa cuando son alimentadas con una dieta rica en grasa (Dorenkott et al. 2014). Entre los componentes bioactivos del chocolate, se destaca el alto porcentaje de flavanoles como monómeros o estructuras poliméricas que pueden tener grados de polimerización incluso mayores a diez (Hammerstone et al. 1999). Los flavanoles son estables en medio ácidos y en el estómago pueden tener un tiempo de residencia hasta de cuarenta minutos, sin sufrir cambios (Rios et al. 2002), lo que indica que la mayor parte de su metabolismo durante su tránsito por el intestino ocurre en el colon debido a la microbiota. Los flavanoles como monómeros son pobremente absorbidos, y como estructuras poliméricas no pueden atravesar la pared intestinal (Gu et al. 2004; Bellik et al. 2012) . El porcentaje de excreción urinaria para los monómeros es de 20 a 55% y para las

procianidinas es de 0.5% reflejando su poca absorción a nivel intestinal (Marie-Paule Gonthier et al. 2003). En su mayoría, los estudios de biodisponibilidad de los flavanoles del cacao y sus derivados se concentran en la búsqueda de metabolitos de fase II que se encuentran en mayor cantidad en orina y plasma comparados con los metabolitos colónicos y los compuestos ingeridos no metabolizados (Urpi-Sarda, Monagas, Khan, Llorach, et al. 2009).

La información disponible en la literatura que permita relacionar la ingesta de cacao, su metabolismo y biodisponibilidad con los beneficios en salud, especialmente en lo relacionado con su baja capacidad de alcanzar el torrente sanguíneo es escasa. Se ha sugerido que los compuestos del cacao deben sufrir modificaciones durante su tránsito por el intestino para ser absorbidos y alcanzar concentraciones adecuadas que les permitan impactar la salud humana. En esta investigación se estableció un modelo de colon *in vitro* con materia fecal humana, con el fin de determinar el efecto de la microbiota en el catabolismo de flavanoles y procianidinas de cacao e identificar los compuestos derivados a partir de ellos. El modelo de investigación que se presenta permite consolidar la evidencia experimental necesaria para describir la diversidad de sustancias generadas a partir de los compuestos ingeridos que no reportan adecuada biodisponibilidad y que en consecuencia, orientan el análisis hacia los catabolitos que contribuyen a los efectos en salud.

2. Hipótesis

Con el establecimiento de un modelo experimental de colon *in vitro* de microbiota humana es posible evaluar el efecto de ésta sobre el catabolismo de flavanoles y procianidinas de derivados de cacao, como modelo predictivo de las sustancias que ejercen efectos positivos en la salud humana.

3. Objetivos

Objetivo General:

Establecer un modelo de colon *in vitro* para la evaluación del metabolismo de los flavanoles de cacao

Objetivos Específicos:

- Establecer las condiciones experimentales: porcentaje de inóculo y concentración de compuestos de referencia en la implementación de un modelo de colon *in vitro*.
- Determinar cuantitativamente los catabolitos de flavanoles y procianidinas producidos por el metabolismo microbiano usando compuestos de referencia y técnicas cromatográficas específicas.
- Aplicar el modelo establecido a una matriz de cacao caracterizada químicamente por ser rica en flavanoles para establecer el impacto del metabolismo colónico sobre las moléculas de interés.

4. Materiales y métodos

4.1 Solventes y estándares

Los solventes hexano, metanol, acetona, acetonitrilo, ácido acético glacial y diclorometano fueron grado HPLC fueron adquiridos de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares primarios: (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido 3,5- dicloro-4 hidroxibenzoico, ácido benzoico, catecol (1,2-dihidroxibenzeno), ácido 3-fenil propiónico, ácido salicílico, ácido(E)-cinámico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 3-hidroxifenil acético, ácido 4- hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxifenil acético, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxifenil acético, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido siríngico, ácido dihidrocafeico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido 2,4,5-trimetoxicinámico y ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Los derivatizantes N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida + Trimetilclorosilano (BSTFA+TMCS) fueron obtenidos de Supelco (Pensilvania, Estados Unidos).

4.2 Sujetos y obtención de las muestras de materia fecal

Las muestras de heces se obtuvieron de voluntarios aparentemente sanos en el marco de un macro proyecto avalado por el comité de bioética de la Sede de Investigación Universitaria (CBE-SIU; acta 14-24-588). Las muestras fueron obtenidas de seis voluntarios (tres hombres y tres mujeres) entre 20 y 40 años con índice de masa corporal entre 18.5 y 24.9 kg/m², sin antecedentes de enfermedades neurodegenerativas, cáncer o enfermedades del tracto gastrointestinal, y sin consumo de antibióticos o antiparasitarios en los últimos tres meses. Los participantes fueron instruidos para abstenerse de consumir alimentos ricos en polifenoles durante cinco días. La depuración de catabolitos de compuestos fenólicos de la dieta se inició colectando una muestra de materia fecal en las horas de la mañana (día 1), la segunda muestra fue colectada el miércoles (día 2) y la tercera el viernes (día 3) de la semana de ensayo (**Figura 8**). Las muestras fueron colectadas y almacenadas en frascos estériles y conducidas al laboratorio donde se procesaron inmediatamente para mantener la viabilidad bacteriana. La depuración de catabolitos de compuestos fenólicos de la dieta se realizó con el fin de favorecer la eliminación tanto de estos

compuestos como de sus catabolitos y establecer la línea base de catabolitos presentes en las muestras.

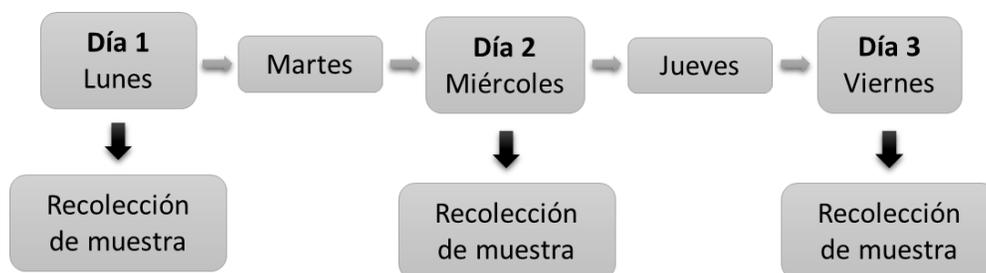


Figura 8. Esquema de toma de muestras para el ensayo de establecimiento de línea base.

4.3 Tratamiento de las muestras de materia fecal

Las muestras de heces se pesaron y diluyeron en solución tampón de carbonato/fosfato (0,11 M-0,02M; pH 5.5) y se homogenizaron a 2000 rpm durante 2 min. Posteriormente, cada muestra se filtró para retirar las partículas de mayor tamaño correspondiente a alimentos no digeridos. Los sustratos (flavanoles puros, matriz de cacao y extracto enriquecido en procianidinas) fueron preparados el día anterior a la obtención de las muestras a las concentraciones requeridas para cada ensayo y diluidos en metanol. Estas soluciones se adicionaron a los frascos de fermentación y evaporó el metanol a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez obtenidos los residuos secos, se les adicionaron los lodos fecales a los porcentajes especificados para cada experimento y a botellas de fermentación sin sustratos (controles). Se incubaron a 37°C en una atmosfera de anaerobiosis utilizando un recipiente anaeróbico con generador e indicador de anaerobiosis (Oxoid AG-025, AN-025 y BR-055B. Hampshire, Inglaterra) para asegurar las condiciones de ausencia de oxígeno durante el tiempo de fermentación. El proceso de fermentación se detuvo por congelación. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes de estas fermentaciones fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis por HPLC y GC-MS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado o mínimo por duplicado.

4.4 Validación del método para la cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina por HPLC-DAD

4.4.1 Condiciones del experimento

Las muestras de lodo fecal de los experimentos de fermentación fueron centrifugadas a 13000 rpm por 30 min a 4°C y diluidas 1:4 con metanol para su posterior inyección en un HPLC equipado con un detector DAD (Agilent technologies 1200. Böblingen, Alemania) y una columna Zorbax Eclipse (XDB-C18 4.6 x 150 mm) (LN B08105, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) con pre columna. Las características del método fueron las siguientes: la temperatura de la columna 30°C, detector DAD monitoreando a 280 nm. Programación de la bomba cuaternaria: 0-5.9 min 10% A (metanol) y 90% B (agua-ácido acético al 0.1%), 5.9-6. min 20% A (80% B) constante hasta 14.9 min; 14.9-15 min 22.5% A (77.5% B) constante hasta 21.9 min; 21.9-22 min 20% B; 22 - 24 min 10% B para re-equilibrar. El flujo de fase móvil fue 1 mL/min y el volumen de inyección de muestra fue 3 µL.

4.4.2 Determinación de atributos de validación para el método de cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina mediante HPLC-DAD en lodos fecales

Se evaluaron los siguientes atributos de desempeño del método analítico: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, de acuerdo a lo descrito en la guía de validaciones de la FDA (U.S. Department of Health and Human services et al. 2001).

Linealidad:

Verificar la linealidad de un método de medición consiste en comprobar que la función matemática que vincula la señal instrumental al resultado analítico es efectivamente una recta (en nuestro caso) para un intervalo definido de valores que se denomina rango lineal de cuantificación. Partiendo de una solución stock de 1000 µg/mL para cada estándar, se prepararon tres curvas de calibración. Cada curva contó con 6 niveles de concentración de 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/mL, realizándose 3 réplicas por nivel (K=6, n=3). Para cada una se estableció la ecuación de la línea recta, se determinó el coeficiente de correlación (r) y el de determinación (r^2) y se realizó una representación gráfica de las rectas de regresión con el programa estadístico Graphpad prism

(versión 5). Además, se llevó a cabo una prueba de homocedasticidad, para verificar la homogeneidad de las varianzas de las réplicas en cada uno de los niveles de concentración. El valor obtenido en la prueba se comparó con el valor teórico extraído de la tabla de prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran G_{tabla} ($\alpha=0.05$; $k=6$; $n=3$) = 0.616.

Precisión:

La precisión se refiere a la dispersión de un conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud. Cuanto menor es la dispersión mayor la precisión. La automatización de los eventos de inyección y la separación cromatográfica pueden producir un aumento de la precisión. Esto se debe a que, con dicha automatización, lo que se logra una disminución de los errores manuales o su corrección inmediata. Se estableció la precisión del método por medio de la evaluación de la reproducibilidad instrumental y la repetibilidad del método. Para la repetibilidad instrumental se realizaron nueve réplicas de inyecciones y para evaluar la repetibilidad del método se analizaron nueve muestras bajo el procedimiento operativo.

Exactitud:

La exactitud de una medida depende de los errores sistemáticos que intervienen en la medición, denotando la proximidad de una medida al verdadero valor y, en consecuencia, la validez de la medida. En este caso se determinó la habilidad del método para producir resultados próximos al valor real en forma independiente del nivel de concentración de los catabolitos, de la siguiente manera: el porcentaje de recuperación fue evaluado mediante el método del estándar cargado en lodos fecales a 3 niveles de concentración para cada estándar: 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 96 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se analizaron tres replicas por cada nivel de concentración y a su vez cada replica se analizó por duplicado.

El valor obtenido en la prueba se comparó con el valor teórico extraído de la tabla de prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran G_{tabla} ($\alpha=0,05$, $k=3$, $n=3$)= 0,870.

Límite de detección (LDD):

El límite de detección es la menor cantidad de un analito cuya señal puede ser distinguida de la señal del ruido o respuesta de fondo del instrumento cuando se analiza un control blanco. El límite

de detección (LDD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. En nuestro estudio este atributo se determinó mediante la inyección de diluciones seriadas de los analitos, encontrando experimentalmente la mínima concentración que produce una respuesta con una intensidad mayor o igual a 6 veces la amplitud del ruido en la base que forma el pico cromatográfico (relación señal/ruido; relación S/R=6:1), se inyectaron 3 repeticiones de cada uno de los analitos a la concentración LDD establecida, aceptando un RSD inferior al 2% en valores S/R experimentales.

Límite de cuantificación (LDC):

Se define el límite de cuantificación como la magnitud mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud. Para métodos bio-analíticos el límite de cuantificación debe cumplir los siguientes requisitos: (i) a respuesta de la señal del analito debe ser mínimo diez veces el ruido, y (ii) debe ser reproducible con coeficiente de variación menor del 20% y exactitud de 80 a 120%. Experimentalmente, se realizaron diluciones de los analitos en el nivel 1 de la curva de calibración, cada dilución con 3 réplicas.

4.5 Cuantificación de catabolitos de polifenoles generados por la microbiota mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS

Se definieron las condiciones para identificar y cuantificar 20 analitos de naturaleza fenólica de acuerdo al patrón de fragmentación de cada uno de sus correspondientes trimetilsilil derivados utilizando un detector selectivo de masas. La selección de estos 20 compuestos de interés tuvo como criterio principal reportes bibliográficos y en otros casos se trata de sustancias de bajo peso molecular indicadores de procesos catabólicos de polifenoles. En la **Tabla 3** se reportan los 20 compuestos objetivo, sus iones característicos y los factores de respuesta calculados para su cuantificación en los ensayos de degradación de los polifenoles. Cada catabolito se cuantificó mediante calibración externa en el rango 100-1200 ng/mL utilizando soluciones agrupadas en cuatro soluciones mix.

Tabla 3. Características espectrales de los catabolitos fenólicos de interés mediante espectrometría de masas.

| Compuestos | Tr. | M ⁺ m/z derivado (% intensidad relativa) | Iones mayoritarios m/z (% intensidad relativa) |
|--------------------------------------|-------|---|--|
| Ácido benzoico | 9,54 | 194 (12) | 179.1 (100), 105.1 (80), 135 (60) |
| Catecol | 10,76 | 254.1 (100) | 254 (100), 151.1 (30) |
| Ácido 3-fenil propiónico | 12,21 | 222.1 (15) | 104.1 (100), 207.1 (30), 91.1 (25) |
| Ácido salicílico | 13,55 | 281 (1) | 267.1 (100), 268 (25), 135(10) |
| Ácido (E)-cinámico | 13,91 | 220.1 (30) | 205.1 (100), 131.1 (80), 161.1 (55) |
| Ácido 3-hidroxi benzoico | 14,20 | 282.1 (40) | 267.1 (100), 223.1 (50), 193(45) |
| Ácido 3-hidroxifenil acético | 14,73 | 296.1 (60) | 164.1 (100), 268 (25), 135(10) |
| Ácido 4- hidroxibenzoico | 14,95 | 282.1 (15) | 267.1 (100),223.1 (80), 193.1 (70) |
| Ácido 4-hidroxifenil acético | 15,08 | 296.1 (45) | 179.1 (100), 164.1 (60), 152.1 (50) |
| Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico | 16,10 | 310.2 (40) | 205.1 (100), 192.1 (80), 310.2 (40) |
| Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico | 16,46 | 310.2 (15) | 179.1 (100), 192.1 (75), 310.2 (15) |
| Ácido vanílico | 16,53 | 312,2 (80) | 297,1 (100), 267,1 (95), 312,2 (80) |
| Ácido gentísico | 16,70 | 370.2 (3) | 355.2 (100), 356.2 (30), 357.2 (15) |
| Ácido 3,4-dihidroxi benzoico | 17,15 | 370.2 (60) | 193 (100), 370.2 (60), 355.2 (30) |
| Ácido 3,4-dihidroxifenil acético | 17,27 | 384.2 (90) | 179.1 (100), 384.2 (90), 267.1 (80) |
| Ácido siríngico | 17,95 | 342.2 (80) | 327.1 (100), 312.1 (83), 342.2 (80) |
| Ácido dihidrocafeico | 18,44 | 398.2 (60) | 179.1 (100), 398.2 (60), 267.1 (45) |
| Ácido cafeico | 20,23 | 396.2 (90) | 219.1 (100), 396.2 (90), 381.2 (29) |
| Ácido 2,4,5-trimetoxicinamico | 20,83 | 310 (90) | 279.1 (100), 310 (90), 221.1 (60) |
| Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamico | 21,16 | 368.2 (100) | 368.2 (100), 338.1 (95), 353.2 (40) |

Tr. Tiempo de retención cromatográfica

4.5.1 Preparación de las muestras de lodos fecales para la cuantificación de catabolitos del metabolismo microbiano por GC-MS

A 50 µL del sobrenadante obtenido de las fermentaciones, fueron adicionados 20 µL de estándar interno (ácido 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoico; 200 µg/mL) para su posterior evaporación a sequedad a temperatura ambiente en cabina de extracción por tres días. Al residuo seco se le adicionaron 100 µL de mezcla acetonitrilo/piridina 1:1 y posteriormente 50 µL de BSTFA+TMCS. El vial tapado se incubó a 40°C por 1 hora, y se transfirió el líquido a un inserto para ser inyectado en el GC-MS.

4.5.2 Condiciones cromatográficas y adquisición de masas en modo Single Ion Monitoring (SIM)

Al cromatógrafo fue inyectado 1 μL de las muestras. El equipo usado fue un Agilent 7890A (Delaware, Estados Unidos) equipado con robot de inyección automático RSI CTC Combipal 3 (Minnesota, Estados Unidos) a una temperatura de 280°C en modo splitless. Se utilizó una columna capilar inerte para garantizar su estabilidad por el uso de derivatizante: Zebron ZB5MSi de 30 m x 250 μm diámetro x 0.25 μm espesor de fase estacionaria, equipada con un guarda columna de 5 metros. El horno estuvo programado así: 90°C por 5 minutos, aumentando 10°C/min hasta alcanzar 300°C durante 2 minutos. El gas portador utilizado fue helio a flujo constante de 1 mL/min. La interfaz con la fuente de ionización se programó a 300°C. Para el desarrollo del método SIM se adquirieron los espectros (en modo Scan) de todos los compuestos target utilizando soluciones de material de referencia (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el rango m/z 45-450 Dalton a una velocidad de 7.45 scan/segundo. Posteriormente se seleccionaron los iones cuantificador e identificador para cada target con una exactitud de masa de 0.1 Dalton y se ajustó el parámetro Dwell time para grupo de iones garantizando 20 scan/segundo. Finalmente, los archivos o registros generados se procesaron mediante deconvolución con el software NIST AMDIS 2.68 para evaluar la pureza espectral de las señales en los tiempos de retención de referencia, la integración del área cromatográfica se realizó definiendo parámetros de integración en el software Agilent Productivity para los iones SIM adquiridos.

4.6 Matriz alimentaria de cacao

Este material fue suministrado por el grupo de investigación y desarrollo de la Compañía Nacional de Chocolates S.A.S. bajo condiciones semi-industriales en planta piloto, es un material experimental obtenido por una metodología que es secreto industrial de esta compañía. Específicamente, en la **Figura 9** se muestra el perfil cromatográfico (HPLC-FLD) del extracto AWAA (acetona, agua, ácido acético 1:1:1) obtenido por extracción en fase sólida SPE (Strata SCX con tamaño de partícula de 55 μm y poro de 70 Å ; Phenomenex 8B-S10-HBJ, California, Estados Unidos), según el método oficial AOAC (Robbins et al. 2012) implantado y validado en el laboratorio de calidad de la misma compañía. La muestra de la matriz de cacao después de la extracción en fase sólida reportó un contenido total de procianidinas de 392 mg/g. En este

extracto se detectaron moléculas con grado de polimerización de DP1-DP10 (DP, Degree of polymerization), además de 31.4 mg/g de (+)-catequina y 106.0 mg/g de (-)-epicatequina.

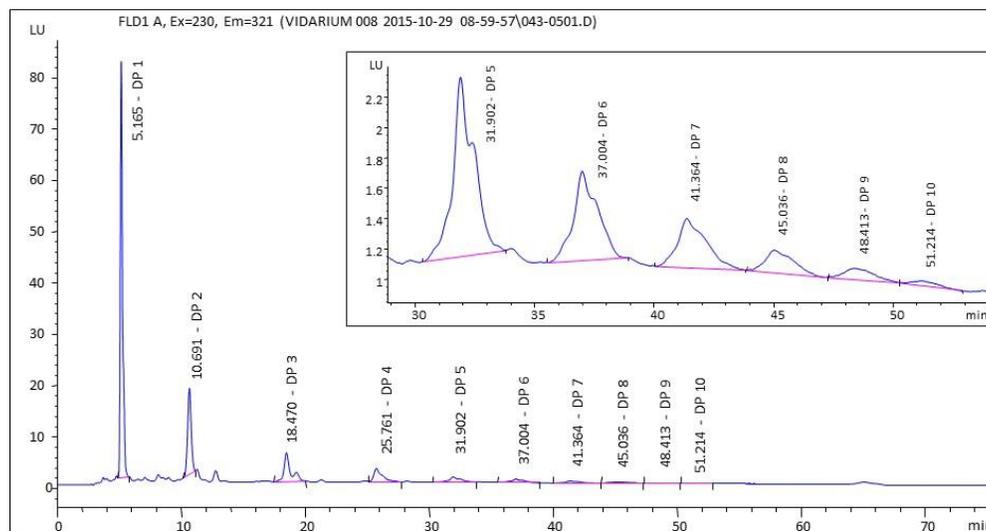


Figura 9. Perfil cromatográfico (HPLC-FLD) de las procianidinas según su grado de polimerización en la matriz alimentaria de cacao.

4.7 Análisis estadístico

El diseño de experimentos se realizó a través del programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Stat point technologies, Inc. Virginia, Estados Unidos). Con este programa se creó un diseño de experimentos tipo box behnken 3^2 , con dos factores a tres niveles para definir las condiciones más favorables para la degradación de (+)-catequina en el modelo de colon *in vitro*. El análisis de componentes principales (PCA) y regresión parcial de mínimos cuadrados con análisis discriminante (PLS-DA) fue utilizado para resumir los cambios en las concentraciones de los metabolitos microbianos resultado de la fermentación con o sin flavanoles. Estos análisis se realizaron por medio del programa R version 3.2.0 (The R Foundation, Vienna, Austria), ejecutando el paquete MUMA (Package muma V.1.4). Análisis de varianzas de una vía con test de Bonferroni fue utilizado para evaluar las diferencias durante las 6 horas de fermentación entre los lodos enriquecidos con sustratos y el lodo control. Este análisis se realizó con el paquete estadístico GraphPad Prim 5.0 (GraphPad software, La Jolla, California, Estados Unidos). También se realizó Anova de medidas repetidas utilizando el programa SPSS versión 23 (IBM. Nueva York, Estados Unidos). La significancia estadística fue definida con un $P < 0,05$.

5. Resultados y Discusión

Atributos de validación para la cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina en lodos fecales por cromatografía líquida HPLC-DAD

El método analítico presentó respuestas directamente proporcionales a la concentración de los analitos en las muestras de lodo fecal dentro de un rango de 2.5-80 µg/mL para cada uno de ellos, con coeficientes de correlación (r) de 0.998 y 0.996 para la (+)-catequina y la (-)-epicatequina respectivamente. Adicionalmente, la prueba de homocedasticidad del rango de calibración para cada analito demostró el cumplimiento de los supuestos de la prueba (distribución normal, adecuada dispersión de los residuales y ausencia de valores influenciales) y permitió obtener valores experimentales aceptables de homogeneidad de varianzas (0.169 para (+)-catequina y 0.469 para (-)-epicatequina) por lo que se concluye que el método analítico es lineal (**Tabla 4**).

Tabla 4. Evaluación de linealidad de la función de calibración de los analitos (+)-catequina y (-)-epicatequina mediante HPLC-DAD

| Analito | Detección DAD (λ , nm) | Rango de Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Ecuación de regresión $Y = mX + b$ | | r^2 | Prueba de linealidad ¹ |
|------------------|---------------------------------|---|------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|
| | | | M | B | | |
| (+)-catequina | 280 | 2,5 – 80 | 2,586 | 0,364 | 0,998 | 0,169 |
| (-)-epicatequina | 280 | 3,12 – 80 | 2,227 | 3,403 | 0,996 | 0,469 |

¹ Valor prueba de homocedasticidad = G_{tabla} ($\alpha=0.05$; $k=6$; $n=3$) = 0.616 (aceptación $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$)

El método fue preciso, presentó la capacidad de proporcionar resultados próximos entre sí, con bajo grado de dispersión entre ellos y con respecto al valor medio. La repetibilidad expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones, es decir, el mismo equipo, el mismo laboratorio, el mismo analista y un corto periodo de tiempo, arrojó resultados dentro de lo especificado. Para precisión del método analítico se obtuvo una variación de 1,78% en lo instrumental y 1,90% para el método en el caso de la (+)-catequina; para la (-)-epicatequina se obtuvo una variación de 2,14% en lo instrumental y 1,84% para el método.

Como se observa en la **Tabla 5**, hubo concordancia entre los resultados experimentales generados por el método, con respecto al valor teórico o de referencia. Por lo tanto, el método analítico fue capaz de proporcionar resultados cercanos al valor teórico o nominal, lo cual se verificó por los resultados de los porcentajes de recobro que se obtuvieron dentro de un rango de 95% a 105%. Para este método los porcentajes de recuperación fueron 99,00% y 102,60 % para (+)-catequina y (-)-epicatequina respectivamente, por lo que se concluye que el método analítico es exacto y el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 5. Evaluación del desempeño del método de cuantificación para (+)-catequina y (-)-epicatequina en lodos fecales mediante HPLC-DAD.

| Analito | Precisión (n=9) | | Exactitud | | LDD (µg/mL) | LDC (µg/mL) |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--|----------------|----------------|
| | Instrumental ¹ (% RSD) | Método ² (% RSD) | Recuperación (n=9) %±SD | Test de Cochran ³ (homogeneidad de varianzas) | | |
| (+)-catequina | 1,78 | 0,90 | 99,00 | 0,316 | 0,78 | 1,56 |
| (-)-epicatequina | 2,14 | 1,84 | 102,60 | 0,701 | 1,56 | 3,12 |

¹ Reproducibilidad (aceptación $RSD \leq 3$); ² Repetibilidad (aceptación $RSD \leq 3$). ³ Valor = G_{tabla} ($\alpha=0.05$; $k=3$; $n=3$) = 0,871 (aceptación $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$). LDD: límite de detección. LDC: límite de cuantificación.

Se estableció que el método analítico detecta (+)-catequina a concentraciones superiores a 0,78 µg/mL y (-)-epicatequina a 1,56 µg/mL, siendo posible cuantificarlos cuando están presentes en las muestras diluidas de lodo fecal a concentraciones de 1,56 µg/mL y 3,12 µg/mL respectivamente. El método de análisis demostró ser selectivo frente a sustancias relacionadas presentes en la matriz de análisis, ya que tiene la capacidad de detectar y cuantificar los analitos de interés sin que algunas sustancias endógenas del metabolismo colónico y/o de origen dietario puedan generar interferencias sobre la prueba, de acuerdo a los adecuados porcentajes de recuperación de los analitos.

No se realizaron procedimientos para la estimación de la robustez de la prueba, la ejecución práctica de la metodología no le permite al ejecutor realizar cambios a lo establecido en el procedimiento operativo de la prueba y sobre las condiciones de operación instrumental, así mismo sobre la calidad de los materiales y los reactivos descritos en este documento. Independientemente de la no realización del estudio de robustez y por lo expuesto anteriormente

se concluyó que el método analítico mediante HPLC-DAD utilizado en esta investigación cumple con las especificaciones de cada uno de los parámetros indicados.

Si bien en la literatura se han reportado estudios de validación para la cuantificación de estas sustancias en matrices variadas (Margalef et al. 2015; Margalef et al. 2014; Urpi-Sarda, Monagas, Khan, Lamuela-Raventos, et al. 2009), para heces humanas no se dispone de información que permita comparar su desempeño. El método validado en este trabajo es exacto, preciso y reproducible. Es un método que puede ser adaptado fácilmente, sencillo, rápido y económico por utilizar una plataforma asequible como es HPLC-DAD, requiere una pequeña cantidad de lodo fecal (50 μ L) que no requiere de manipulaciones complejas por lo que se minimiza la posible pérdida de analitos, evitando la subcuantificación. El método de análisis es cuantitativo y permite el análisis simultáneo de los dos compuestos de interés en esta investigación.

Cuantificación de catabolitos de flavanoles y procianidinas en lodos fecales por GC/MS –SIM

Con este trabajo se logró desarrollar un método analítico basado en GC/MS que permitió la identificación y cuantificación de metabolitos de degradación de flavanoles y procianidinas de cacao. Se realizó un análisis de pureza espectral para cada uno de los targets utilizando, los perfiles iónicos TIC (total ion current) por deconvolución, análisis de la forma de las señales y filtrado del ruido espectral. De lo anterior no se observó interferencia de iones producto de coelución de otras sustancias en los tiempos seleccionados para la adquisición de iones SIM. Se llevó a cabo la construcción de curvas de calibración para cada uno de los catabolitos de interés obteniendo coeficientes de determinación (r^2) apropiados, la linealidad del rango de calibración de los analitos se realizó mediante la evaluación de homogeneidad de factores de respuesta encontrando en todos los casos una desviación RSD inferior al 3%. La **Tabla 6** presenta el factor de respuesta medio para cada uno de los catabolitos target con el cual se realizó su cuantificación. En todos los casos los LDD bajo las condiciones de la prueba fueron inferiores a 50 ng/mL encontrando unas condiciones adecuadas de sensibilidad para la detección y cuantificación de los catabolitos target.

Tabla 6. Iones cuantificador e identificador, ecuación de regresión, coeficiente de determinación y factor de respuesta de las 20 moléculas de interés analizadas por GS-MS.

| Compuestos | Iones SIM | | Ecuación de regresión Y= mX + b | r ² | Factor de respuesta |
|--------------------------------------|-----------|---------|------------------------------------|----------------|---------------------|
| | Ion C. | Ion Id. | | | |
| Ácido benzoico | 179,1 | 105,1 | 1548,5x+90878 | 0.997 | 0.0005865 |
| Catecol | 254,1 | 151,1 | 0,0002x-29,243 | 0.999 | 0.0002157 |
| Ácido 3-fenilpropiónico | 104,1 | 207,1 | 0,001x-62,599 | 0.995 | 0.0008176 |
| Ácido salicílico | 267,1 | 268,1 | 0,001x+63,488 | 0.996 | 0.0012065 |
| Ácido (E)-cinámico | 205,1 | 131,1 | 0,0017x+23,304 | 0.998 | 0.0019640 |
| Ácido 3-hidroxibenzoico | 267,1 | 223,1 | 0,0009x-12,286 | 0.995 | 0.0009301 |
| Ácido 2 (3-hidroxifenil) acético | 179,1 | 268,1 | 0,0037x+59,649 | 0.992 | 0.0048768 |
| Ácido 4-hidroxibenzoico | 267,1 | 223,1 | 0,0009x+28,306 | 0.976 | 0.0009082 |
| Ácido 2 (4-hidroxifenil) acético | 179,1 | 164,1 | 0,0018x+69,818 | 0.992 | 0.0029671 |
| Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico | 205,1 | 192,1 | 0,0006x+29,624 | 0.995 | 0.0007925 |
| Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico | 179,1 | 192,1 | 0.0007x+13.101 | 0.999 | 0.0016148 |
| Ácido vanílico | 297,1 | 267,1 | 0,0005x+32,79 | 0.998 | 0.0027242 |
| Ácido gentísico | 355,2 | 356,2 | 0,0011x+15,469 | 0.999 | 0.0011715 |
| Ácido 3,4-dihidroxibenzoico | 193,1 | 370,2 | 0,0037x-21,846 | 0.993 | 0.0035451 |
| Ácido 2 (3,4-dihidroxifenil) acético | 179,1 | 384,2 | 0,0008x+74,243 | 0.997 | 0.0010780 |
| Ácido siríngico | 327,1 | 312,1 | 0.004x+58.728 | 0.994 | 0.0054158 |
| Ácido dihidrocafeico | 179,1 | 398,2 | 0,0002x+11,379 | 0.895 | 0.0009445 |
| Ácido cafeico | 219,1 | 396,2 | 0,0029x+9,8737 | 0.963 | 0.0033605 |
| Ácido 2,4,5-trimetoxicinámico | 279,1 | 310,1 | 0,0013x+16,591 | 0.996 | 0.0038311 |
| Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico | 368,2 | 338,1 | 0,0087x+302,19 | 1 | 0.0034084 |

Ion C: ion cuantificador; Ion Id: ion Identificador; r2: coeficiente de determinación.

Establecimiento de las condiciones más favorables de degradación de (+)-catequina en un modelo de colon in vitro

El diseño estadístico fue de tipo Box Behnken 3², con dos factores a tres niveles, lodo fecal a 1%, 5.5% y 10 % y concentración de (+)-catequina a 100, 150 y 200 µg/mL para definir las condiciones más favorables para la degradación de este sustrato en el modelo de colon *in vitro*. En el experimento se hicieron dos bloques de muestras con once corridos cada uno y 3 niveles centrales (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de materia fecal y concentración de (+)-catequina utilizados en la fermentación y porcentaje de degradación alcanzado a una hora de incubación. Los datos están expresados como la media \pm SD de 4 réplicas.

| Porcentaje de materia fecal | (+)-catequina ($\mu\text{g/ml}$) t=0 | (+)-catequina ($\mu\text{g/ml}$) t=1h | % Degradación |
|-----------------------------|---|--|------------------|
| 1 | 100 | 43,17 \pm 6,60 | 56,82 \pm 6,60 |
| 1 | 150 | 111,90 \pm 8,62 | 25,39 \pm 5,74 |
| 1 | 200 | 186,28 \pm 8,76 | 6,85 \pm 4,38 |
| 5,5 | 100 | 18,50 \pm 4,42 | 81,49 \pm 4,42 |
| 5,5 | 150 | 83,80 \pm 3,08 | 44,13 \pm 2,05 |
| 5,5 | 200 | 139,45 \pm 7,59 | 30,27 \pm 3,79 |
| 10 | 100 | 12,87 \pm 2,00 | 86,41 \pm 1,74 |
| 10 | 150 | 18,75 \pm 5,34 | 85,99 \pm 2,33 |
| 10 | 200 | 67,14 \pm 0,78 | 66,44 \pm 0,47 |

La fermentación de (+)-catequina se realizó según las concentraciones definidas en el diseño de experimentos a partir de materia fecal proveniente de un voluntario. Se tomó una alícuota de las fermentaciones a 3 tiempos: 1, 3 y 6 horas (**Figura 10**). Las muestras fueron procesadas para su inyección en el HPLC para la cuantificación de la (+)-catequina que no fue metabolizada por la microbiota fecal humana. En las muestras antes de la adición del sustrato no se detectó (+)-catequina. Las fermentaciones a 1% de lodo fecal contenían (+)-catequina hasta la sexta hora de incubación incluso a la menor concentración de sustrato evaluada, 100 $\mu\text{g/mL}$. Este porcentaje de materia fecal es insuficiente para la degradación del sustrato a los tiempos evaluados en el experimento.

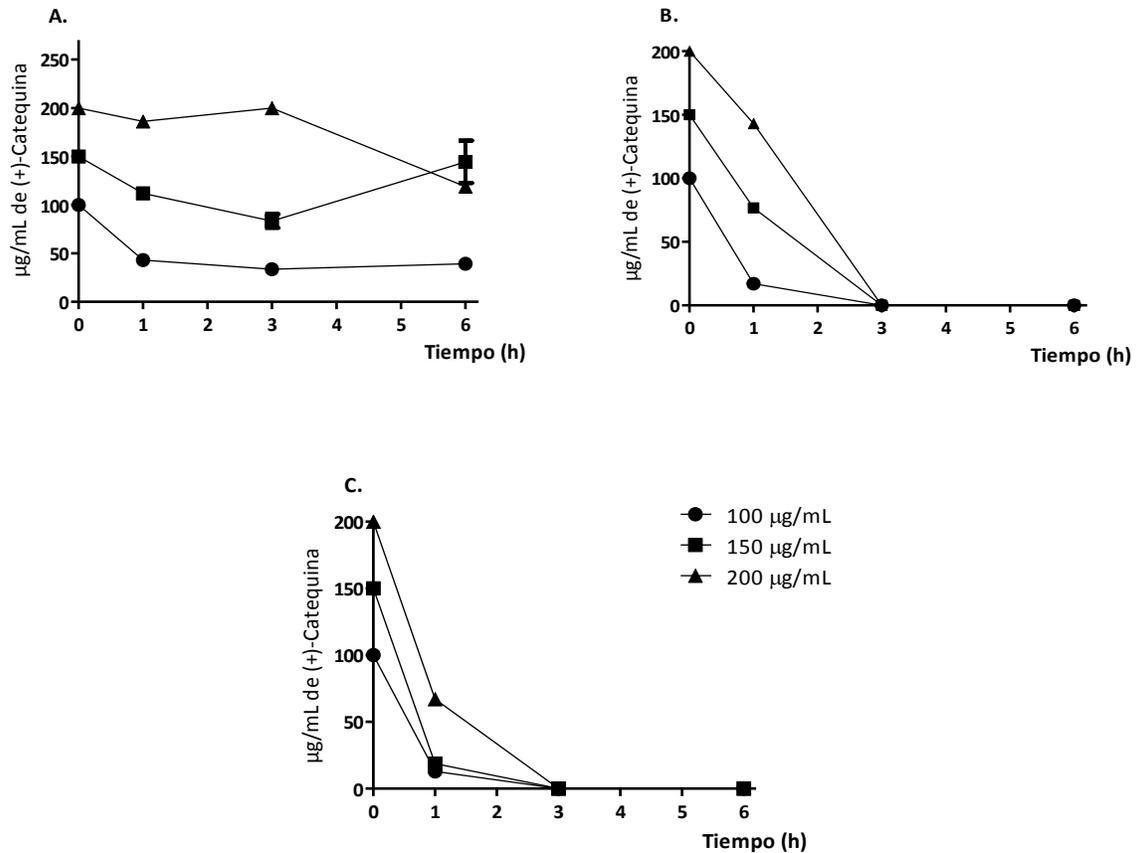


Figura 10. Fermentación de (+)-catequina en los lodos fecales a través del tiempo. A. 1% de lodo fecal; B. 5,5% de lodo fecal y C. 10% de lodo fecal. Concentración de (+)-catequina: 200 µg/mL, 150 µg/mL y 100 µg/mL. Cada ensayo consta de cuatro replicas en dos ensayos independientes.

A partir de la tercera hora no se detectó el sustrato en las fermentaciones a 5,5% y 10% de inóculo incluso en las muestras con la mayor concentración de (+)-catequina, 200 µg/mL. El porcentaje de degradación de (+)-catequina alcanzado en el ensayo con 5,5% y 10% de lodo fecal es del 100% a partir de la tercera hora.

Para el diseño de nuestro modelo de colon *in vitro* se utilizó solución tampón de carbonato/fosfato (0,11 M-0,02M; pH 5.5) para evitar el uso de medios de cultivo que pueden seleccionar especies bacterianas y aportar elementos que pueden ser degradados y producir catabolitos que interfieren con los resultados. Además, la materia fecal seca contiene 30% de bacterias, 10–20 % de grasas, 10–20% de materia inorgánica, 2–3% de proteínas, 30% de fibra no digerida de los alimentos, constituyentes de los fluidos intestinales y células epiteliales (Anna-marja Aura 2005) aportando

por si misma los nutrientes que requieren las bacterias para seguir viables por algunas horas. Además, se realizó el diseño de experimento con (+)-catequina ya que ha sido reportado que la degradación de este sustrato por las bacterias de la microbiota fecal requiere que se transforme primero en (+)-epicatequina haciendo que la producción de los catabolitos producto de la fermentación tome más tiempo (Tzounis et al. 2008).

Cuantificación de ácidos fenólicos en lodos fecales

Las condiciones para identificar y cuantificar 20 ácidos fenólicos que por reportes o por similitud estructural pueden ser producto del metabolismo microbiano fueron definidas. Según el método cromatográfico desarrollado se estableció el tiempo de retención, la masa después de la derivatización con BSTFA-TMS y los iones mayoritarios por el modo SIM/SCAN. Igualmente se calculó la ecuación de regresión, el coeficiente de determinación y el factor de respuesta para la cuantificación de estas moléculas en los lodos fecales. En las **Tablas 6 y 8** se enuncian los parámetros más importantes.

Tabla 8. Tiempo de retención, masa del compuesto e iones mayoritarios de las 20 moléculas de interés analizadas por GS-MS.

| Compuestos | Tiempo de retención | Masa => derivatización | Iones mayoritarios (intensidad relativa) |
|--------------------------------------|---------------------|------------------------|--|
| Ácido benzoico | 9,54 | 194 (12) | 179 (100), 105,1 (80) |
| Catecol | 10,763 | 254,1 (100) | 254 (100), 151,1 (30) |
| Ácido 3-fenil propiónico | 12,214 | 222,1 (15) | 104,1 (100), 207,1 (30) |
| Ácido salicílico | 13,554 | 281 (1) | 267,1 (100), 268,1 (25) |
| Ácido (E)-cinámico | 13,911 | 220,1 (30) | 205,1 (100), 131,1 (80) |
| Ácido 3-hidroxibenzoico | 14,206 | 282,1 (40) | 267,1 (100), 223,1 (50) |
| Ácido 2 (3-hidroxifenil) acético | 14,734 | 296,1 (60) | 164,1 (100), 268,1 (25) |
| Ácido 4- hidroxibenzoico | 14,956 | 282,1 (15) | 267,1 (100), 223,1 (80) |
| Ácido 2(4-hidroxifenil) acético | 15,086 | 296,1 (45) | 179,1 (100), 164,1 (60) |
| Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico | 16,102 | 310,2 (40) | 205,1 (100), 192,1 (80) |
| Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico | 16,467 | 310,2 (15) | 179,1 (100), 192,1 (75) |
| Ácido vanílico | 16,531 | 312,2 (80) | 297,1 (100), 267,1 (95) |
| Ácido gentísico | 16,701 | 370,2 (3) | 355,2 (100), 356,2 (30) |
| Ácido 3,4-dihidroxi benzoico | 17,153 | 370,2 (60) | 193 (100), 370,2 (60) |
| Ácido 2(3,4-dihidroxifenil) acético | 17,271 | 384,2 (90) | 179,1 (100), 384,2 (90) |
| Ácido siríngico | 17,956 | 342,2 (80) | 327,1 (100), 312,1 (83) |
| Ácido dihidrocafeico | 18,446 | 398,2 (60) | 179,1 (100), 398,2 (60) |
| Ácido cafeico | 20,236 | 396,2 (90) | 219,1 (100), 396,2 (90) |
| Ácido 2,4,5-trimetoxicinámico | 20,834 | 310 (90) | 279,1 (100), 310 (90) |
| Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico | 21,16 | 368,2 (100) | 368,2 (100), 338,1 (95) |

r^2 : coeficiente de determinación,

Para definir las condiciones más adecuadas para la producción de metabolitos se analizaron por GC las muestras del diseño de experimentos incubadas durante 6 horas para conocer cuál de las variables produce mayor cantidad de metabolitos. A través del programa Agilent chemstation Productivity se determinaron las áreas de los picos y se calculó su concentración utilizando el factor de respuesta. Se detectaron y cuantificaron los catabolitos: ácido benzoico, ácido 3-fenil propiónico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 2 (3-hidroxifenil) acético, ácido 4- hidroxibenzoico, ácido 2 (4-hidroxifenil) acético, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido gentísico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido dihidrocafeico, ácido cafeico. Se realizó la sumatoria de los metabolitos detectados (**Figura 11**) y se pudo establecer, que el inóculo al 1% fue insuficiente para catabolizar el sustrato, dado los bajos niveles de metabolitos detectados. Cuando el inóculo se utilizó al 10% y la concentración del sustrato a 100 $\mu\text{g/mL}$ se

produjo una cantidad total de metabolitos mayor que en los inóculos de 1 y 5,5%, y no hubo una diferencia significativa cuando se fermentó a este porcentaje de inóculo con mayores cantidades de sustrato. De lo anterior se estableció para las fermentaciones un 10% de lodo fecal y 100 µg/mL de (+)-catequina y (-)-epicatequina como las condiciones más favorables para la degradación de los sustratos lo que conlleva a la mayor producción de metabolitos microbianos.

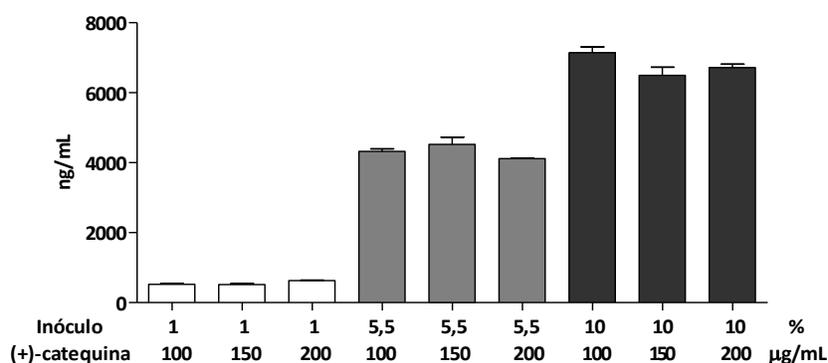


Figura 11. Sumatoria de catabolitos detectados por GC-MS en lodos fecales a 1%, 5,5% y 10% incubados con (+)-catequina a 100, 150 y 200 µg/mL durante 6 horas. Las barras de error representan desviación estándar de tres réplicas.

Depuración de catabolitos colónicos en muestras de materia fecal

Seis voluntarios durante cinco días se abstuvieron de consumir alimentos con altos contenidos de compuestos fenólicos como el café y el chocolate para disminuir la línea base de metabolitos microbianos en las heces de estos voluntarios previo a la adición de los sustratos. Tres de los voluntarios eran consumidores habituales de alimentos ricos en ácidos clorogénicos (como consumir >4 tazas de café al día) y tres no consumidores (no consumidores de café). Tal como se consignó en materiales y métodos, las muestras se colectaron en tres momentos y se diluyeron individualmente al 10% en buffer carbonato fosfato a pH 5,5 y se realizó la fermentación sin la adición de sustratos. Se tomaron alícuotas a las 0, 3 y 6 horas de incubación y se analizaron por GC-MS. Los resultados de los análisis de componentes principales se presentan en la **Figura 12**. En la **figura 12-A** (Score plot) es notable como se agrupan las muestras de cada voluntario según el día de ensayo. Dos voluntarios consumidores de alimentos ricos en ácidos clorogénicos se destacan de los demás (L: color fucsia y V: color azul) en el día 1 y 2 del estudio.

La variabilidad observada entre las muestras de los voluntarios también ha sido evidenciada en otros trabajos que demostraron las diferencias que existen en la degradación de compuestos con microbiota fecal obtenida de diferentes individuos. Gross y colaboradores en 2010 probaron la bioconversión de polifenoles de té y vino por la microbiota fecal humana en 10 voluntarios y comprobaron la gran variabilidad existente (G. Gross et al. 2010). Estas dos matrices alimentarias fueron degradadas a un número limitado de metabolitos claves y cada sujeto mostró un perfil metabólico diferenciado en su composición, tiempo de aparición y concentración. En un estudio realizado con extracto de vino rojo y microbiota intestinal provenientes de 3 voluntarios también se evidenciaron las diferencias en la producción de catabolitos sin presentarse cambios en la composición microbiana para las especies que fueron evaluadas (Sánchez-Patán et al. 2012).

Producción de catabolitos en los grupos de voluntarios

Las muestras de los no consumidores (G1) y los consumidores habituales de ácidos clorogénicos (G2) fueron usadas para realizar la fermentación de (+)-catequina y (-)-epicatequina a 100 µg/mL, extracto enriquecido en procianidinas a 19,5 µg/mL y extracto de cacao a una concentración de procianidinas de 3,9 µg/mL. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación tal y como se describió en la sección de materiales y métodos. Después de la fermentación se cuantificaron los metabolitos, detectándose 15 de los 20 metabolitos para los que se desarrolló el método analítico. En el análisis de componentes principales se evidenció la gran diferencia entre los grupos G1 y G2 con una proporción acumulada de la varianza de 66.1% (**Figura 13**). Los catabolitos más discriminantes fueron ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido siríngico. Este experimento mostró que el ácido siríngico se produjo en las fermentaciones con las muestras G2 y no con G1, mientras que ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico y ácido 2 (3,4-dihidroxifenil) acético se detectó exclusivamente en G1. Más notable aún es que el ácido siríngico no ha sido reportado como producto del metabolismo de flavanoles en modelos *in vitro* con microbiota, en cambio ha sido reportado como producto del consumo de cerveza en humanos (Ghiselli et al. 2000).

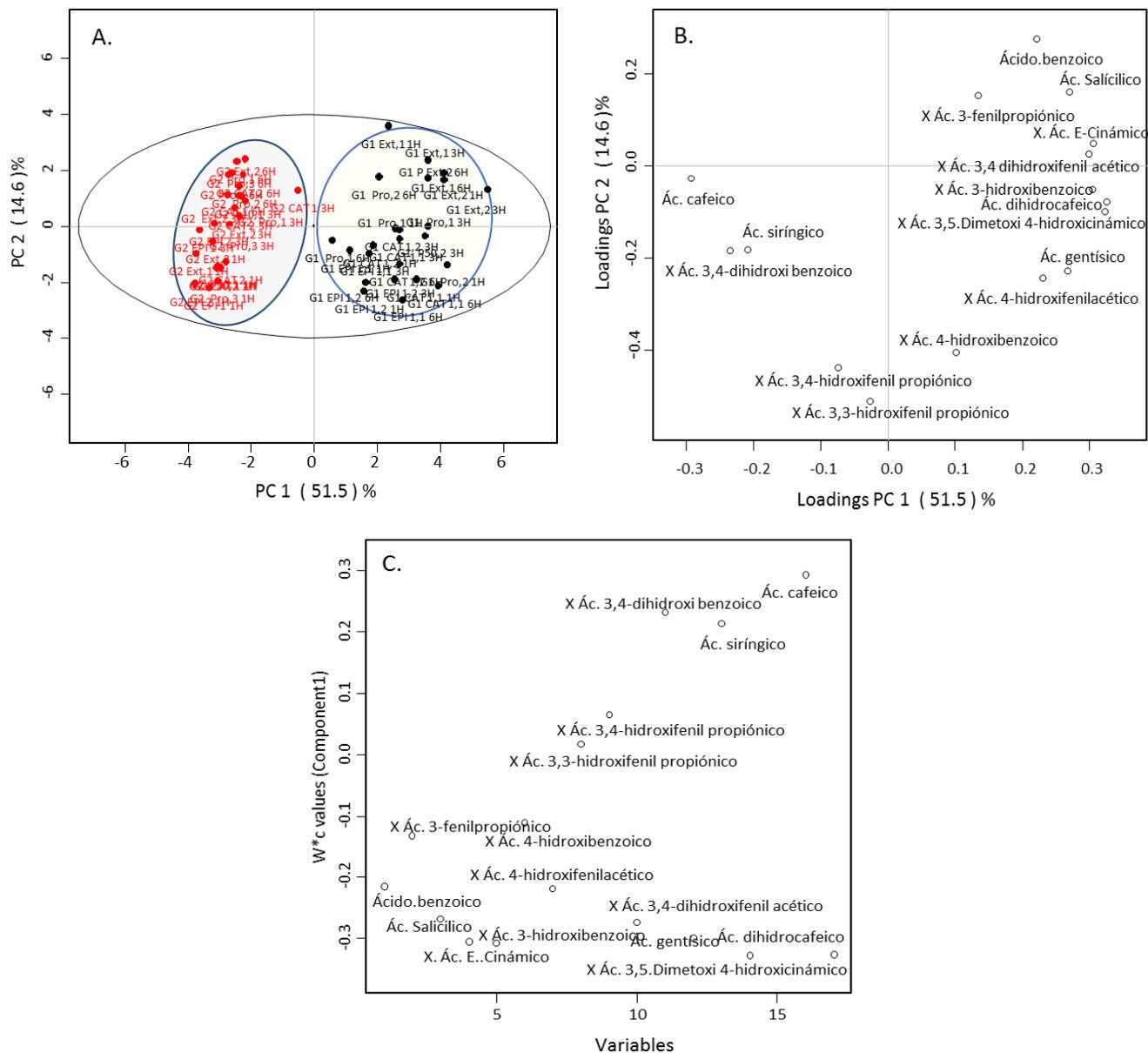


Figura 13. Análisis de componentes principales y discriminante de los lodos fecales de G1 y G2 fermentados con (+)-catequina y (-)-epicatequina (a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), extracto de cacao (a 3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de procianidinas y extracto enriquecido en procianidinas (a 19,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A. Score plot; B, Loading plot. C, PLS-DA. Proporción acumulada de la varianza de 66.1%.

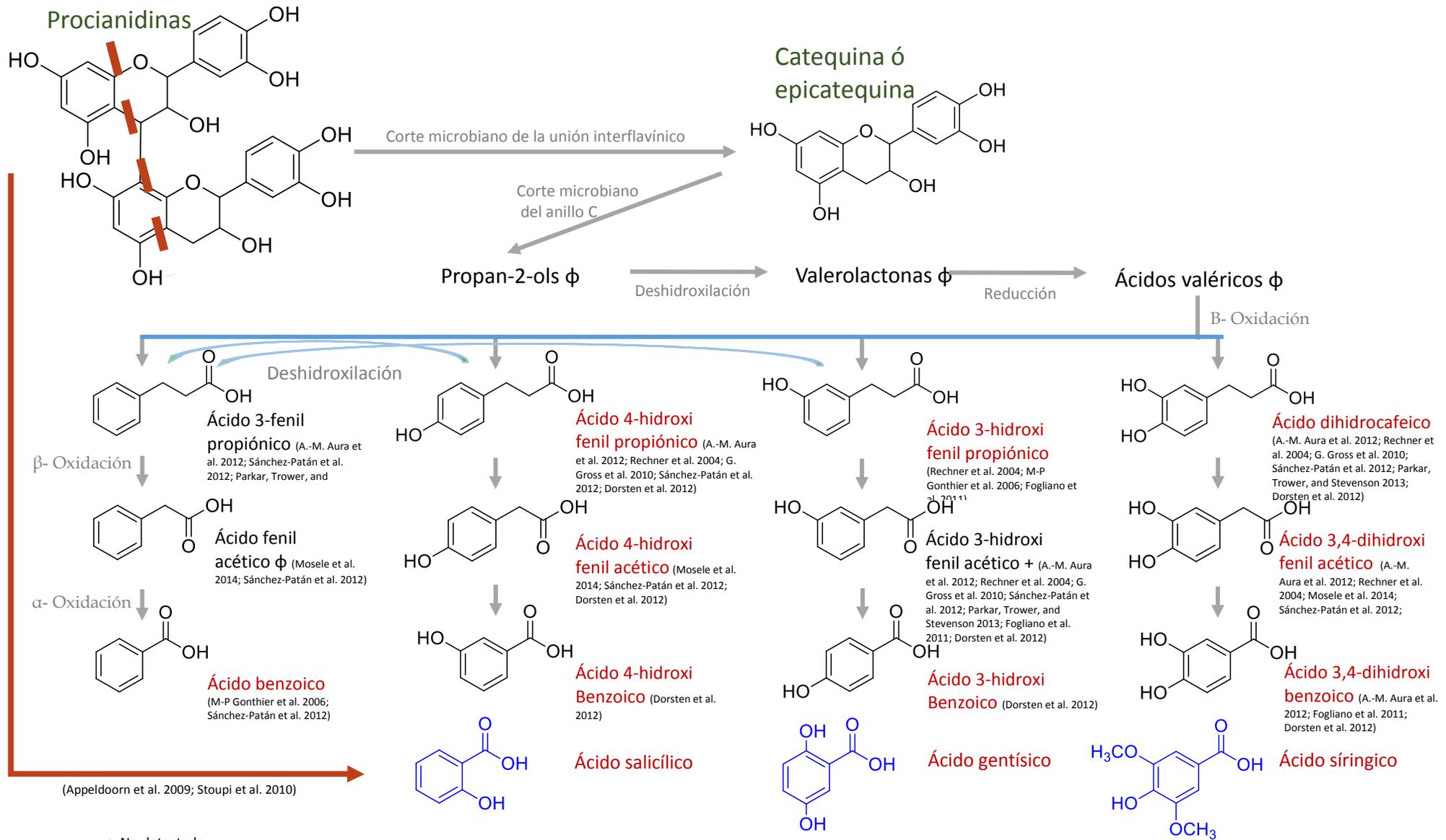
De lo anterior se definió la utilización de lodos fecales provenientes de los voluntarios no consumidores de fuentes ricas en ácidos clorogénicos como el café, para los experimentos posteriores. Es necesario destacar la gran importancia de caracterizar y conocer la variabilidad

inter individual, así como contar con una proceso de depuración para disminuir las interferencias generadas por las fuentes alimentarias de interés.

En un estudio realizado por Tzounis y colaboradores (Tzounis et al. 2008) en medio de cultivo con 10% heces fecales humanas se realizó la fermentación de (+)-catequina y (-)-epicatequina a 150 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Los autores concluyeron que la (+)-catequina es metabolizada a mayor velocidad que la (-)-epicatequina, la cual a las 24 horas de fermentación aún se encontraba presente en los lodos fecales, incluso en los fermentos en los que se adicionó la menor concentración del sustrato. El método basado en HPLC-DAD utilizado por Tzounis y col, detectó 3 metabolitos: 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona, 5-fenil- γ -valerolactona y ácido 3-fenilpropiónico. El método analítico basado en GC/MS utilizado en nuestro trabajo logró cuantificar en los lodos fecales 15 metabolitos de los cuales 12 presentaron diferencias significativas respecto al control (**Esquema 1**). Por su parte Takagaki y Nanjo (2013), utilizaron una plataforma más sofisticada basada en LC-MS y RMN para cuantificar catabolitos de la fermentación de (+)-catequina y (-)-epicatequina en heces de ratas Wistar (Takagaki and Nanjo 2013). En el trabajo de Takagaki, se lograron identificar 13 compuestos en los que se encontraron 11 metabolitos intermediarios como propanol-2-oles, valerolactonas y ácidos valéricos, y 2 compuestos de metabolismo avanzado como 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico tras 60 horas de incubación.

En el **Esquema 1** se resume la totalidad de las moléculas analizadas en nuestro trabajo. El metabolismo microbiano de las procianidinas comienza con el corte interflavínico para liberar monómeros. Estos monómeros sufren posteriormente ruptura del anillo C para formar propanol-2-oles los cuales por deshidroxilación forman valerolactonas que se reducen a ácidos valéricos. Estos compuestos son considerados metabolitos intermediarios y son metabolizados rápidamente lo que dificulta su cuantificación (Margalef et al. 2015). Siguiendo la vía metabólica propuesta, se producen por β -oxidaciones ácidos fenilpropiónicos y ácidos fenilacéticos que luego son transformados en ácidos benzoicos por α -oxidación. En esta gráfica aparecen 3 metabolitos (ácido siríngico, ácido gentísico y ácido salicílico) que fueron detectados en nuestro trabajo ($P < 0.05$; comparado con el control). Estos tres compuestos no han sido reportados previamente como producto del metabolismo microbiano en ensayos *in vitro*. Dado que el ácido siríngico es un ácido fenólico metilado, mientras que el ácido gentísico y ácido salicílico tienen un grupo hidroxilo en la

posición 2, en dos trabajos se propone una nueva ruta de catabolismo de procianidinas diferente al que comienza con la ruptura del enlace interflavínico. En esta ruta propuesta, no hay separación de monómeros sino una fisión de anillos en moléculas diméricas que producirán moléculas de menor peso molecular que pueden tener grupos hidroxilos en posiciones diferentes a los C3 ó C4 como las detectadas en nuestro trabajo con grupos OH en posiciones C2 (Appeldoorn et al. 2009; Stoupi et al. 2010). Y hasta el momento solo *Clostridium cocoides* y *Eubacterium rectale* han sido reportadas como las bacterias responsables de la degradación de flavanoles (Tzounis et al. 2008).



+ No detectado
 *Diferencias significativas respecto al control

Esquema 1. Catabolismo microbiano de procianidinas

Catabolitos producidos por la microbiota fecal humana a partir de: (+)-catequina, (-)-epicatequina, extracto enriquecido en procianidinas y matriz de cacao

Con el fin de determinar el efecto del tratamiento, el tiempo y la interacción tratamiento*tiempo, se realizó una ANOVA de medidas repetidas (**Tablas 9 y 10**) donde se analizó la producción de metabolitos cuantificados en los lodos fecales con las muestras del grupo de no consumidores de café fermentadas con (+)-catequina y (-)-epicatequina a 100 µg/mL, extracto enriquecido en procianidinas a 19,5 µg/mL y extracto de cacao a una concentración de procianidinas de 3,9 µg/mL. En la **Tabla 9** se muestra el análisis para 10 catabolitos que cumplieron los supuestos de la del modelo (distribución normal de los residuos y homogeneidad de varianzas). Se evaluaron las diferencias ($P < 0,05$) en la producción de cada catabolito dado (i) el tratamiento: fermentación con (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidinas y matriz de cacao (ii) el tiempo: 0, 1, 3 y 6 horas y (iii) de la interacción tratamiento* tiempo. Para los 10 compuestos consignados en la **Tabla 9** el tratamiento tuvo diferencias estadísticamente significativas. El ácido benzoico y el ácido salicílico presentaron diferencias significativas debido al tratamiento, esto explicado por la mayor producción de estos dos catabolitos en las muestras fermentadas con la matriz de cacao. El ácido 3-hidroxibenzoico también presentó este comportamiento, pero la diferencia con los demás tratamientos se observó en la sexta hora de incubación. El ácido 4-hidroxibenzoico tuvo un aumento en las muestras cuyo sustrato fue (-)-epicatequina y principalmente en la tercera hora de fermentación. El ácido 2-(4-hidroxifenil) acético tuvo diferencias significativas tanto para el tiempo como para el tratamiento. En este caso los fermentos con los monómeros tuvieron un comportamiento muy similar con cantidades altas comparadas con los demás tratamientos y los tiempos, ya que a seis horas hay una diferencia significativa con demás muestras. El tiempo, el tratamiento y la interacción fueron significativos para el ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico; los monómeros tuvieron la mayor producción de este catabolito, mostrando un aumento marcado entre la tercera y sexta hora de incubación. En el ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, el tratamiento, el tiempo y la interacción fueron significativos, pero a diferencia del ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, este tuvo valores más altos a la primera hora de incubación en la que los tratamientos tuvieron una diferencia significativa con el control. El ácido gentísico presentó diferencias en el tiempo y la interacción. En este caso los monómeros a las 6 horas presentaron mayores niveles de este metabolito.

Para el ácido 3,4-dihidroxibenzoico fue significativo el efecto del tratamiento y la interacción. Este metabolito tuvo un comportamiento diferente para cada sustrato como puede observarse en los

gráficos de medias marginales (**Figura 14**). En el control y las fermentaciones con (+)-catequina y procianidinas, a pesar de que a la primera hora tienen valores muy similares, muestran tendencias muy diferentes a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Por último, el ácido dihidrocafeico tuvo diferencias estadísticamente significativas al comparar los cuatro tratamientos con el control. Los niveles de este catabolito en los 4 tratamientos fueron elevados.

Tabla 9. Catabolitos de la fermentación en un modelo de colon *in vitro* bajo diferentes tratamientos: control; (+)-catequina ; (-)-epicatequina (100 µg/mL), extracto enriquecido en procianidinas (19,5 µg/mL) y extracto de cacao (a una concentración de procianidinas 3,9 µg/mL). Los datos están expresados como la media de la concentración ± SD. Valor P de los tratamientos, el tiempo y la interacción: tiempo*tratamiento. ANOVA de medidas repetidas.

| Catabolito | Tiempo | Control | (+)-Catequina | (-)-Epicatequina | Procianidinas | Extracto | Valor P | | |
|-------------------------------------|----------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------|-------------|--------|
| | | Media±SD (ng/mL) | | | | | | Tratamiento | Tiempo |
| Ácido benzoico | 0 horas | 618,85 ± 39,54 | | | | | | | |
| | 1 hora | --- | 591,79 ± 44,44 | 576,69 ± 22,84 | 770,64 ± 2,60 | 1315,22 ± 243,31a | <0,001 | 0,219 | 0,081 |
| | 3 horas | 779,44 ± 81,52 | 622,62 ± 39,54 | 556,19 ± 3,58 | 742,415 ± 18,46 | 1064,45 ± 23,15 | | | |
| | 6 horas | 779,57 ± 84,25 | 634,65 ± 14,39 | 571,50 ± 16,87 | 654,86 ± 8,05 | 981,10 ± 88,87 | | | |
| 0 horas | 122,37 ± 25,03 | | | | | | | | |
| Ácido salicílico | 1 hora | --- | 118,35 ± 18,29 | 118,36 ± 2,77 | 141,60 ± 7,29 | 156,66 ± 9,53 | 0,002 | 0,368 | 0,330 |
| | 3 horas | 110,62 ± 3,45 | 117,55 ± 4,67 | 108,57 ± 4,60 | 128,32 ± 1,28 | 168,44 ± 12,46b | | | |
| | 6 horas | 103,94 ± 11,29 | 121,56 ± 4,92 | 112,14 ± 5,77 | 120,38 ± 1,92 | 151,71 ± 12,89 | | | |
| | 0 horas | 111,27 ± 30,26 | | | | | | | |
| Ácido 3-hidroxi benzoico | 1 hora | --- | 152,92 ± 16,73 | 139,72 ± 3,19 | 160,53 ± 16,91 | 139,61 ± 3,52 | 0,004 | 0,723 | 0,904 |
| | 3 horas | 102,23 ± 3,68 | 141,06 ± 3,58 | 134,02 ± 3,13 | 147,79 ± 0,28 | 153,73 ± 6,88 | | | |
| | 6 horas | 105,55 ± 10,57 | 142,075 ± 21,87 | 128,39 ± 17,53 | 139,53 ± 0,99 | 157,84 ± 2,77 | | | |
| | 0 horas | 55,49 ± 8,60 | | | | | | | |
| Ácido 4-hidroxi benzoico | 1 hora | --- | 111,51 ± 16,60a | 129,68 ± 32,87a | 123,53 ± 6,35a | 76,23 ± 11,89 | <0,001 | 0,225 | 0,584 |
| | 3 horas | 61,24 ± 3,38 | 108,51 ± 6,68 | 165,66 ± 4,44b | 117,86 ± 0,30b | 99,07 ± 2,21 | | | |
| | 6 horas | 58,10 ± 4,45 | 109,21 ± 3,37c | 145,70 ± 11,68c | 127,28 ± 29,29c | 115,045 ± 3,40c | | | |
| | 0 horas | 469,35 ± 271,43 | | | | | | | |
| Ácido 2 (4-hidroxifenil) acético | 1 hora | --- | 1296,17 ± 151,12a | 1216,11 ± 62,70a | 1151,38 ± 176,03a | 1332,47 ± 608,23 | 0,016 | 0,003 | 0,058 |
| | 3 horas | 1009,13 ± 55,41 | 1889,03 ± 99,61 | 1911,67 ± 12,65 | 1670,64 ± 44,23 | 1635,37 ± 317,22 | | | |
| | 6 horas | 1675,22 ± 162,60 | 2029,75 ± 157,36 | 2010,96 ± 245,33 | 988,73 ± 358,08 | 1348,59 ± 31,32 | | | |
| | 0 horas | 583,47 ± 66,49 | | | | | | | |
| Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico | 1 hora | --- | 553,70 ± 90,25 | 495,46 ± 44,06 | 694,72 ± 102,74 | 433,45 ± 14,74 | <0,001 | 0,09 | <0,001 |
| | 3 horas | 246,75 ± 3,91 | 622,42 ± 27,92b | 641,51 ± 30,73b | 659,79 ± 16,68b | 381,84 ± 88,07b | | | |
| | 6 horas | 434,03 ± 20,59 | 1041,18 ± 86,81c | 1016,19 ± 25,06c | 580,62 ± 145,51 | 286,335 ± 7,48 | | | |
| | 0 horas | 49,96 ± 7,31 | | | | | | | |
| Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico | 1 hora | --- | 214,96 ± 27,96a | 204,58 ± 14,19a | 176,23 ± 28,24a | 113,86 ± 6,05 | 0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | 3 horas | 62,76 ± 7,56 | 113,29 ± 4,63 | 97,30 ± 1,52 | 96,97 ± 5,48 | 84,99 ± 5,54 | | | |
| | 6 horas | 130,03 ± 27,52 | 119,72 ± 11,12 | 117,78 ± 9,61 | 98,40 ± 23,00 | 77,51 ± 1,99 | | | |
| | 0 horas | 84,84 ± 93,38 | | | | | | | |
| Ácido gentísico | 0 horas | 84,84 ± 93,38 | | | | | 0,001 | 0,155 | 0,017 |

| Catabolito | Tiempo | Control | (+)-Catequina | (-)-Epicatequina | Procianidinas | Extracto | Valor P | | |
|------------------------------|---------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------|-------------|--------|
| | | Media±SD (ng/mL) | | | | | | Tratamiento | Tiempo |
| | 1 hora | --- | 165,78 ± 7,84a | 162,65 ± 5,20a | 129,61 ± 19,48a | 134,81 ± 40,34a | | | |
| | 3 horas | 17,94 ± 4,82 | 180,73 ± 10,77b | 166,57 ± 0,19b | 154,99 ± 3,81b | 132,98 ± 30,49b | | | |
| | 6 horas | 25,77 ± 10,58 | 239,43 ± 10,71c | 214,82 ± 15,71c | 101,99 ± 3,27c | 144,04 ± 2,72c | | | |
| Ácido 3,4-dihidroxi benzoico | 0 horas | 82,08 ± 34,61 | | | | | | | |
| | 1 hora | --- | 79,22 ± 2,35 | 209,30 ± 8,34a | 112,28 ± 15,11 | 82,38 ± 6,71 | <0,001 | 0,155 | 0,007 |
| | 3 horas | 49,41 ± 5,91 | 115,49 ± 6,23b | 107,26 ± 22,81b | 124,91 ± 2,05b | 76,68 ± 26,12 | | | |
| | 6 horas | 60,32 ± 3,92 | 118,47 ± 8,53c | 66,91 ± 3,60 | 187,33 ± 28,67c | 101,49 ± 3,23 | | | |
| | | | | | | | | | |
| Ácido dihidrocafeico | 0 horas | ND | | | | | | | |
| | 1 hora | --- | 1129,37 ± 91,06a | 1027,48 ± 29,63a | 1449,41 ± 289,43a | 1011,19 ± 193,35a | <0,001 | 0,118 | 0,64 |
| | 3 horas | 97,55 ± 32,16 | 1062,94 ± 81,77b | 924,11 ± 19,21b | 1054,47 ± 120,24b | 1108,97 ± 180,05b | | | |
| | 6 horas | 132,59 ± 83,01 | 1103,57 ± 149,03c | 888,15 ± 62,62c | 971,16 ± 113,99c | 1057,84 ± 57,14c | | | |
| | | | | | | | | | |

---: no detectado; NC: no cuantificado.

^a $P < 0,05$ respecto al tiempo 0 del control

^b $P < 0,05$ respecto al control a las 3 horas

^c $P < 0,05$ respecto al control a las 6 horas

Los compuestos: 3-fenil propiónico, ácido (E)-cinámico, ácido 2-(3,4-dihidroxifenil) acético, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico y ácido cafeico no cumplieron los supuestos del modelo (ANOVA de medidas repetidas). Se intentaron hacer transformaciones logarítmicas y cuadráticas sin éxito. Por tal razón fueron analizados utilizando estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis test). El ácido 3,4-(dihidroxifenil) acético a las 6 horas de fermentación fue el único que presentó un aumento significativo con respecto al control ($P < 0,05$).

Tabla 10. Concentraciones de catabolitos y desviación estándar de las fermentaciones de lodo fecal con y sin sustratos (control).

| Compuesto | Tiempo | Control | (+)-Catequina | (-)-Epicatequina | Procianidinas | Extracto cacao | Valor P |
|--------------------------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|---------|
| | | | | | | | |
| Ácido 3-fenil propiónico | 0 horas | 4519,03 ± 517,03 | | | | | |
| | 1 hora | --- | 5648,70 ± 713,42 | 5145,13 ± 245,38 | 5674,92 ± 737,13 | 5045,04 ± 722,88 | 0,241 |
| | 3 horas | 4918,00 ± 165,28 | 6818,65 ± 213,54 | 6605,04 ± 71,27 | 6886,65 ± 23,98 | 6704,20 ± 1093,37 | 0,131 |
| | 6 horas | 5875,44 ± 505,50 | 9988,06 ± 733,42 | 8923,75 ± 484,63 | 8588,43 ± 103,11 | 8008,64 ± 230,09 | 0,053 |
| Ácido (E)-cinámico | 0 horas | 436,24 ± 467,56 | | | | | |
| | 1 hora | --- | 352,01 ± 63,34 | 214,41 ± 25,92 | 394,33 ± 61,14 | 401,92 ± 69,68 | 0,478 |
| | 3 horas | 410,19 ± 38,75 | 363,73 ± 65,69 | 296,54 ± 8,25 | 410,19 ± 38,38 | 395,69 ± 10,46 | 0,568 |
| | 6 horas | 316,69 ± 35,01 | 303,35 ± 17,97 | 254,06 ± 18,17 | 298,64 ± 47,55 | 297,19 ± 40,60 | 0,697 |
| Ácido 3,4-dihidroxifenil acético | 0 horas | ND | | | | | |
| | 1 hora | --- | 89,17 ± 33,3 | 103,46 ± 24,06 | 171,17 ± 21,55 | 182,56 ± 70,04 | 0,057 |
| | 3 horas | ND | 139,14 ± 9,07 | 115,64 ± 24,60 | 237,72 ± 3,44 | 226,98 ± 56,76 | 0,057 |
| | 6 horas | ND | 147,51 ± 24,35 | 74,42 ± 0,27 | 198,18 ± 17,30 | 224,65 ± 31,17 | 0,049 |
| Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico | 0 horas | 180,98 | | | | | |
| | 1 hora | --- | 355,15 ± 4,78 | 253,22 ± 42,47 | 302,79 ± 41,58 | 302,05 ± 58,71 | 0,072 |
| | 3 horas | 95,46 ± 11,20 | 305,07 ± 33,21 | 235,04 ± 9,51 | 247,09 ± 5,43 | 261,51 ± 60,58 | 0,095 |
| | 6 horas | 123,61 ± 56,70 | 288,52 ± 27,48 | 245,93 ± 9,43 | 207,02 ± 20,88 | 251,38 ± 19,02 | 0,055 |
| Ácido cafeico | 0 horas | 93,35 ± 34,29 | | | | | |
| | 1 hora | --- | 141,31 ± 19,84 | 142,45 ± 15,71 | 64,57 ± 3,93 | 95,01 ± 4,20 | 0,107 |
| | 3 horas | 53,50 ± 2,45 | 146,07 ± 7,82 | 144,015 ± 5,60 | 106,06 ± 35,11 | 117,12 ± 22,42 | 0,061 |
| | 6 horas | 66,05 ± 14,06 | 191,17 ± 13,73 | 239,08 ± 14,96 | 231,28 ± 139,97 | 122,10 ± 8,96 | 0,074 |

ND: no detectado; ---: no cuantificado

En un trabajo realizado por Aura y colaboradores (A.-M. Aura et al. 2012), en el cual utilizaron GC-TOFMS, realizaron la búsqueda de metabolitos microbianos producidos por bacterias obtenidas de heces humanas por la fermentación de vino tinto y uva Sirah liofilizada, alimentos con altas concentraciones de flavanoles y procianidinas. Los ácidos 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácido dihidrocafeico, ácido (3,4-dihidroxifenil) acético y ácido benzoico presentaban diferencias significativas comparados con las muestras control. En este trabajo, se estableció un modelo similar al usado en nuestro estudio, 10% de inóculo en buffer carbonato fosfato pH 5,5 y los metabolitos que se reportan también fueron detectados en nuestro trabajo, algo de esperarse teniendo en cuenta que las matrices utilizadas por ellos también tienen altas cantidades de procianidinas. Gross y colaboradores (G. Gross et al. 2010) utilizaron GC-MS y RMN para la determinación de catabolitos luego de la fermentación de vino, jugo de uvas y té negro por 24 horas con heces fecales de 10 voluntarios. Las matrices complejas fueron degradadas a un limitado número de catabolitos. Cada sujeto demostró un perfil metabólico específico diferente tanto en la composición y el tiempo de fermentación como en la concentración. Esta fuerte variación individual también se observó en nuestro estudio con las muestras provenientes de los 6 voluntarios en el ensayo de depuración de polifenoles; cuando se compararon los voluntarios de manera individual diferían notablemente, pero a medida que pasaron los días de la depuración, el contenido de los catabolitos de polifenoles fue disminuyendo y las muestras obtenidas de los sujetos fueron asemejándose.

Mun y colaboradores en 2013, validaron la cuantificación de 47 metabolitos en muestras de heces humanas después del consumo de vino rojo y ginebra por UPLC-ESI-MS/MS (Mun et al. 2013). A pesar del elevado número de compuestos evaluados, solo se detectaron los ácidos 3,5-dihidroxibenzoico; 3-O-metilgálico; p-cumárico; 3-fenilpropiónico; 3,4 dihidroxibenzoico; vanílico; sirínico y 4-hidroxi-5-(fenil) valérico. En nuestro trabajo logramos detectar un número mayor de compuestos, sin embargo, no incluimos compuestos generados en la primera parte de la ruta metabólica de los flavanoles como los ácidos valéricos, por tratarse de productos intermediarios. Déprez y colaboradores, en un ensayo *in vitro* con microbiota obtenida de heces humanas, incubaron por 48 horas procianidinas obtenidas de hojas de sauce y por GC-MS se identificaron los ácidos 3-fenilpropiónico; 3-(3-hidroxifenil) propiónico; 3-(4-hidroxifenil) propiónico; 2-(3-hidroxifenil) acético; 2-(4-hidroxifenil) acético y 4-hidroxifenil valérico (Déprez et al. 2000). Los autores no detectaron ácidos dihidroxilados y asumieron que la presencia de compuestos aromáticos no fenólicos como el ácido 3-fenilacético y el ácido benzoico no era específico del

catabolismo de las procianidinas, los cuales podían derivar del metabolismo de otras moléculas como ácidos aromáticos presentes en el medio de cultivo o naturalmente presentes en las muestras de heces. Estos dos puntos son de gran importancia toda vez que cuando no se evalúan tiempos prolongados de fermentación, no es necesario el uso de medios de cultivo, y en segundo lugar, hace énfasis en la gran necesidad de establecer adecuadamente la línea base para reducir la cantidad de compuestos que aporta la materia fecal cuando se quieren realizar estudios *in vitro* de metabolismo microbiano sobre matrices alimentarias.

En el mismo sentido de nuestro trabajo, Fogliano y colaboradores utilizaron un modelo de colon *in vitro* para la fermentación de una fracción soluble de cacao. En este trabajo se detectaron tres metabolitos, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácido 3,4-dihidroxi benzoico y ácido 2-(3-hidroxifenil) acético (Fogliano et al. 2011). Al igual que en nuestro estudio buscaron ácido vanílico y no fue detectado. Por HPLC-UV-ECD y HPLC-qTOF-MS, Appeldoorn y colaboradores detectaron ácido (3,4-dihidroxifenil) acético y 5-(3,4-dihidroxifenil)- γ -valerolactona como los principales metabolitos producidos por la microbiota después de 8 horas de fermentación con dímeros de procianidinas (Appeldoorn et al. 2009). También detectaron ácido 2-(3-hidroxifenil) acético, ácido 2-(4-hidroxifenil) acético, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácidos fenil valericos, fenil valerolactonas monohidroxiladas y 1-(3',4'-dihidroxifenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroxifenil) propan-2-ol. Y a diferencia de estos dos trabajos, el ácido 2-(3-hidroxifenil) acético no fue detectado. En nuestro trabajo los propan-2-oles, las valerolactonas y los ácidos valéricos no hicieron parte de los metabolitos seleccionados, principalmente por ser productos intermediarios del metabolismo de flavanoles que rápidamente se degradan para transformarse en ácidos fenólicos de menor peso molecular como los que fueron cuantificados

Al analizar los gráficos de medias marginales estimadas (**Figura 14**) se puede observar que los ácidos 3-fenil propiónico y dihidrocafeico se producen de manera similar con los 4 sustratos usados. Estos dos catabolitos han sido reportados en varios trabajos como productos de la fermentación de flavanoles (A.-M. Aura et al. 2012; Rechner et al. 2004; G. Gross et al. 2010; Sánchez-Patán et al. 2012; Parkar, Trower, and Stevenson 2013; Dorsten et al. 2012). El ácido 3,4-dihidroxifenil acético se encontró aumentado en las fermentaciones en las que se usó el extracto enriquecido en procianidinas y la matriz de cacao. En contraste a lo anterior, esta misma molécula

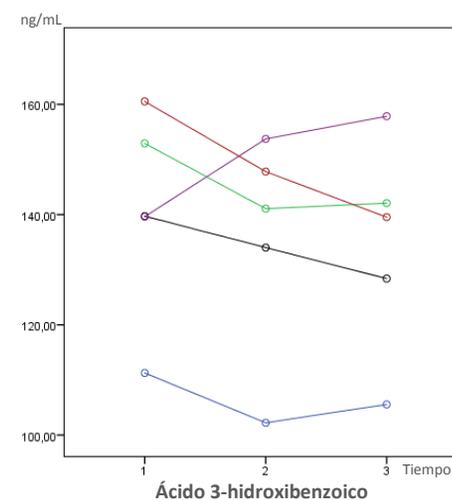
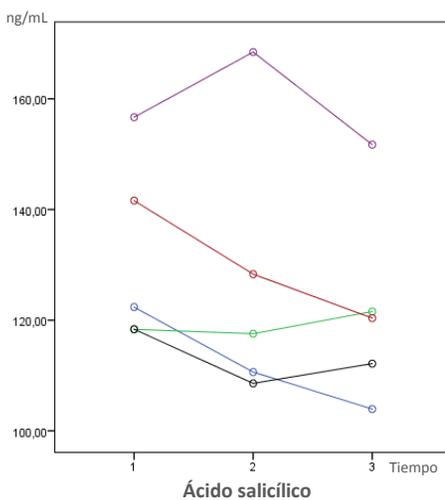
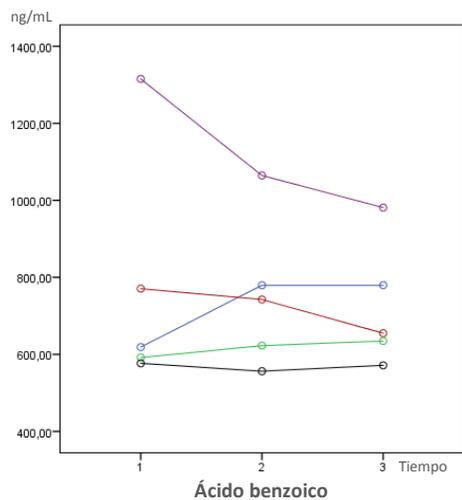
se detectó en menor cantidad en los tratamientos con los monómeros y en el grupo control no fue detectado. Este compuesto ha sido reportado como el principal metabolito colónico de procianidinas purificadas de diferentes matrices alimentarias (A.-M. Aura et al. 2012; Rechner et al. 2004; Mosele et al. 2014; Sánchez-Patán et al. 2012; Dorsten et al. 2012; Appeldoorn et al. 2009; Ou et al. 2014). Los ácidos 2-(4-hidroxifenil) acético; 3-(3-hidroxifenil) propiónico y gentísico se producen de manera considerablemente mayor a partir de monómeros que de los sustratos con procianidinas. El proceso de depuración de polifenoles se llevó a cabo con el fin de disminuir la concentración de catabolitos colónicos en las muestras de heces y así poder establecer una línea base de los metabolitos. Pese a ello, solo el ácido 3,4-dihidroxifenil acético no fue detectado en el control. Los demás metabolitos analizados en el estudio estuvieron presentes en los controles, demostrando que es difícil eliminarlos de este tipo de muestras tan complejas, sin embargo, la depuración de polifenoles demostró ser una estrategia que permite disminuirlos.

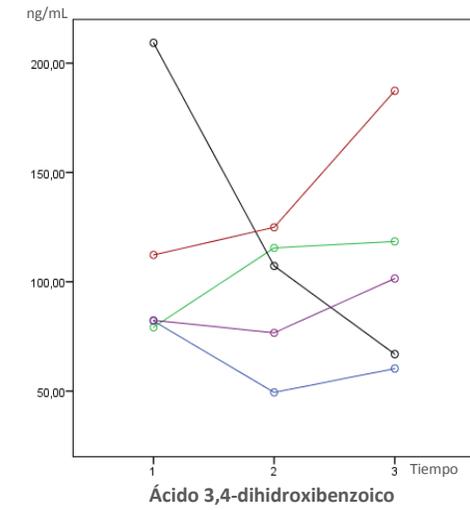
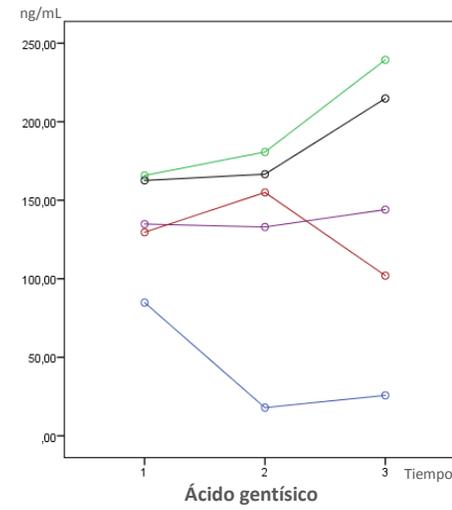
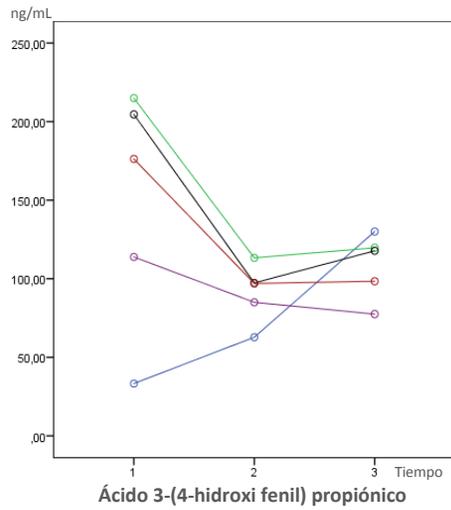
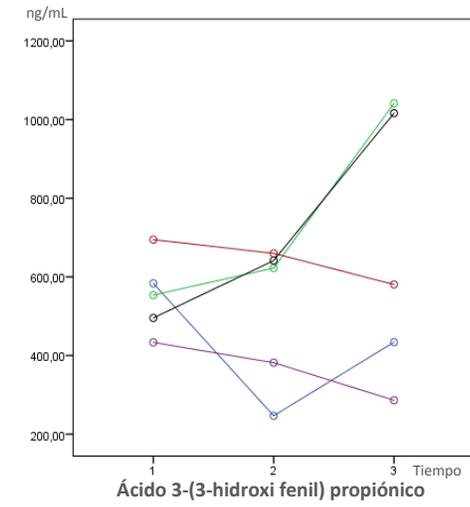
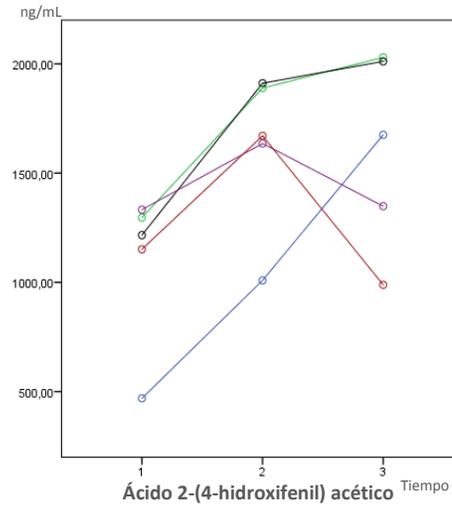
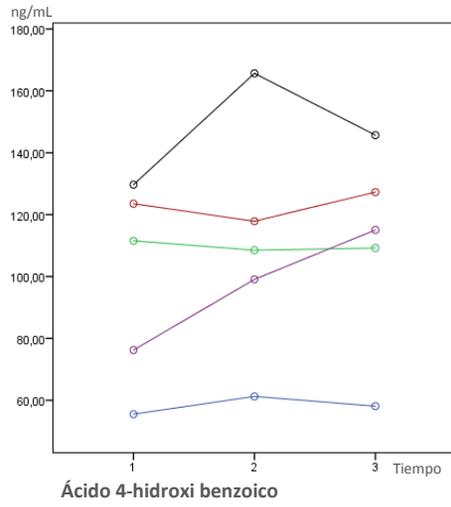
En este trabajo se estableció y estandarizó un modelo de colon *in vitro* para la evaluación del catabolismo de flavanoles. Se identificaron y cuantificaron 12 catabolitos que se producen a partir de la fermentación de flavanoles y procianidinas, libres y en matrices de cacao. Entre ellos el ácido benzoico, ácido 3-hidroxi benzoico, ácido 4-hidroxi benzoico, ácido 2 (4-hidroxifenil) acético, ácido 3,4-dihidroxifenil acético, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido 3,4-dihidroxi benzoico y el ácido dihidrocafeico han mostrado efectos biológicos como antioxidante, inhibitorio de la adhesión plaquetaria, antitrombótico y antiinflamatorio, actividades relacionadas con la salud cardiovascular (María Monagas et al. 2009; Urpi-Sarda, Monagas, Khan, Lamuela-Raventos, et al. 2009; Maria Monagas et al. 2010; Del Rio et al. 2013). Probablemente, los compuestos responsables del efecto benéfico en la salud son tanto los monómeros biodisponibles como los catabolitos colónicos de flavanoles.

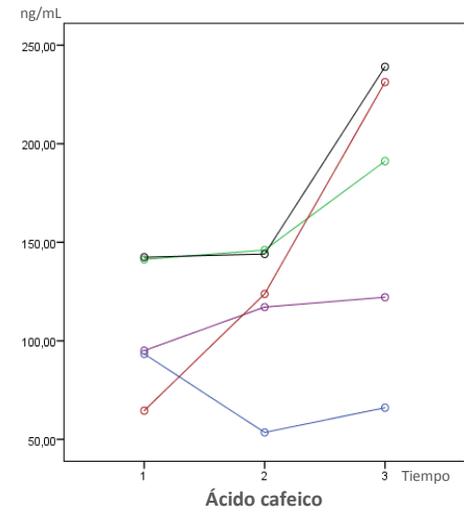
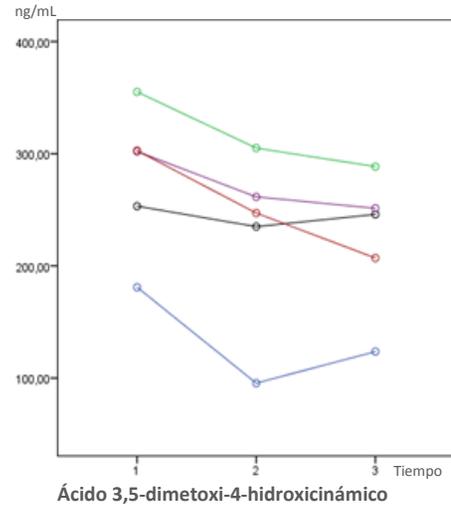
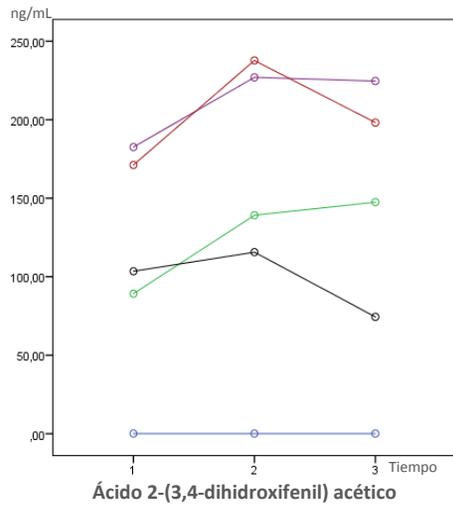
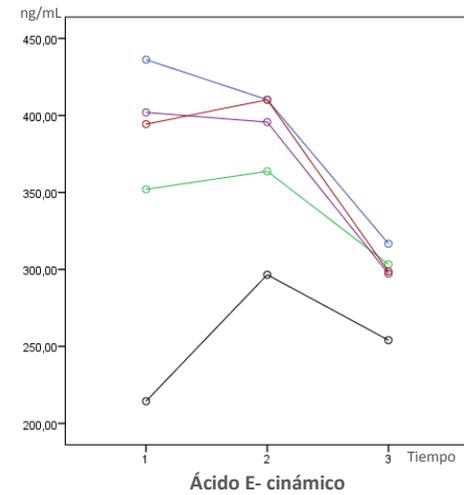
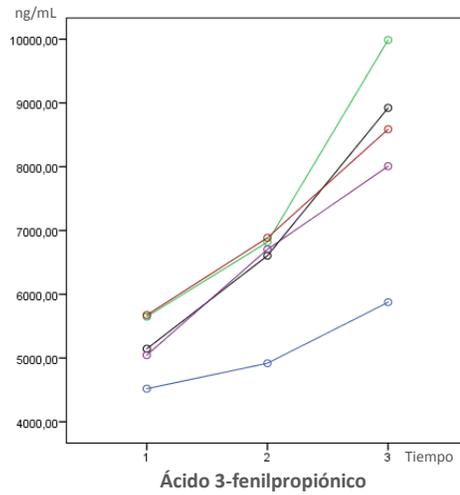
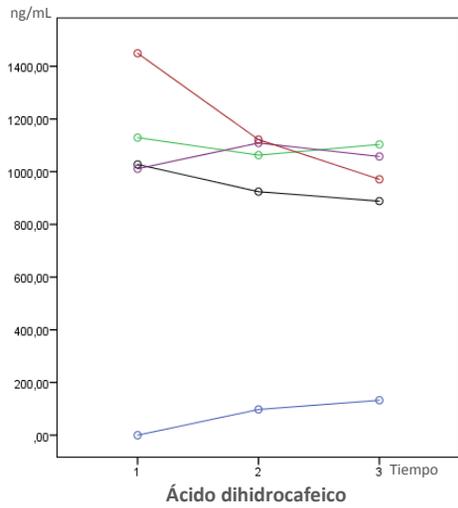
Cabe destacar que no se encontró en la literatura revisada ningún trabajo que estudie la diferencia que puede existir en el metabolismo microbiano de flavonoides dado los hábitos de la dieta de los voluntarios, como ejemplo de ello consumidores de alimentos ricos en ácidos clorogénicos de fuentes como el café y en no consumidores de este. Lo anterior plantea nuevas preguntas de investigación para comprender cómo la microbiota puede ser modulada por hábitos alimentarios y a su vez cómo estos cambios pueden llegar a redundar en efectos relacionados con los perfiles metabólicos de la microbiota colónica.

Tratamiento
 Basal
 (+)-catequina
 (-)-epicatequina
 Extracto de cacao
 Procianidinas

Figura 14. Medias marginales estimadas de los 15 metabolitos detectados en el grupo de no consumidores de café fermentados solos y con los sustratos (+)-catequina y (-)-epicatequina a 100 µg/mL, extracto enriquecido en procianidinas a 19,5 µg/mL y matriz de cacao a una concentración de procianidinas de 3,9 µg/mL. Tiempo 1: hora cero para el control, 1 hora para los lodos con sustratos; tiempo 2: 3 horas; tiempo 3: 6 horas.







6. Conclusiones

En el presente trabajo se validó un método cuantitativo basado en HPLC-DAD para la cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina en lodos fecales. Adicionalmente se establecieron las condiciones para la cuantificación por GC/MS en heces de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, método con el cual un total de 20 ácidos fenólicos pueden ser analizados en un corrido cromatográfico sin necesidad de un excesivo tratamiento de la muestra. En cuanto a la fermentación *in vitro* se definieron las condiciones para la degradación de (+)-catequina por la microbiota fecal humana en condiciones de anaerobiosis: 10 % de lodo fecal en buffer carbonato-fosfato pH 5,5 con 100 µg/ml de sustrato. Se evaluaron las muestras de seis voluntarios y fueron evidentes las diferencias interindividuales. Después de cinco días de depuración de polifenoles, se observó una disminución de la línea base de los analitos y cómo las muestras de los diferentes voluntarios en el último día de restricción tendieron a agruparse.

En nuestro trabajo se implementó un modelo de colon *in vitro* para la fermentación con microbiota fecal humana de (+)-catequina, (-)-epicatequina, una matriz de cacao y un extracto enriquecido en procianidinas. Se usaron muestras de no consumidores de fuentes ricas en ácidos clorogénicos como el café y consumidores habituales éste y gracias al análisis de componentes principales se logró evidenciar que los dos grupos se separan. Fue relevante en este trabajo que en la fermentación con heces del grupo de no consumidores de café se detectó ácido siríngico, mientras que los ácidos 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico y 3,4-dihidroxifenil acético se detectaron exclusivamente en las fermentaciones con heces de los no consumidores de café.

En las fermentaciones realizadas con los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina, los metabolitos más representativos fueron los ácidos 2-(4-hidroxifenil) acético, 3-(3-hidroxifenil) propiónico y gentísico. Este último no ha sido reportado hasta el momento como metabolito de la microbiota colónica después de la fermentación con flavanoles. Para la matriz de cacao se detectaron los ácidos benzoico y salicílico, y para el extracto enriquecido en procianidinas se presentó un aumento considerable en la cantidad de ácido 3,4-dihidroxibenzoico. El ácido 2-(3,4-dihidroxifenil) acético aumentó de manera importante en los tratamientos que contenían procianidinas. El ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido 3,4-dihidroxi benzoico se produjeron en mayor

cantidad en el tratamiento con (-)-epicatequina, mientras que el ácido 3-(4-hidroxifenil)própionico, el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico y el ácido dihidrocafeico se generaron en cantidades comparables en los 4 tratamientos usados, presentando diferencias significativas cuando se compararon con los controles sin sustratos.

Referencias Bibliográficas

- Actis-Goretta, Lucas, Javier Ottaviani, and Cesar Fraga. 2006. "Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme Activity by Flavanol-Rich Foods." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 229–34. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/Cacao/2006, Actis-Goretta. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods.pdf.
- Appeldoorn, M M, J P Vincken, a M Aura, P C Hollman, and H Gruppen. 2009. "Procyanidin Dimers Are Metabolized by Human Microbiota with 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)acetic Acid and 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-Gamma-Valerolactone as the Major Metabolites." *J Agric Food Chem* 57 (3): 1084–92. doi:10.1021/jf803059z.
- Archivio, Massimo D, Carmelina Filesi, Rosaria Vari, and Beatrice Sczzocchio. 2010. "Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies." *International Journal of Molecular Sciences* 11: 1321–42. doi:10.3390/ijms11041321.
- Aron, Patricia M, and James a Kennedy. 2008. "Flavan-3-Ols: Nature, Occurrence and Biological Activity." *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (1): 79–104. doi:10.1002/mnfr.200700137.
- Aura, A, K A O L Eary, G W Iliamson, M O Jala, M B Ailey, and R P Uupponen Imia. 2002. "Quercetin Derivatives Are Deconjugated and Converted to Hydroxyphenylacetic Acids but Not Methylated by Human Fecal Flora in Vitro." *J. Agric. Food Chem* 50 (6): 1725–30. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Aura et al. - 2002 - Quercetin Derivatives Are Deconjugated and Converted to Hydroxyphenylacetic Acids but Not Methylated by Human Fecal.pdf.
- Aura, Anna-marja. 2005. "In Vitro Digestion Models for Dietary Phenolic Compounds." file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Aura - 2005 - In vitro digestion models for dietary phenolic compounds.pdf.
- Aura, Anna-Marja. 2008. "Microbial Metabolism of Dietary Phenolic Compounds in the Colon." *Phytochemistry Reviews* 7 (3): 407–29. doi:10.1007/s11101-008-9095-3.
- Aura, Anna-Marja, Pilar Martin-Lopez, Karen Anne O'Leary, G Williamson, Kirsi-Marja Oksman-Caldentey, Kaisa Poutanen, and Celestino Santos-Buelga. 2005. "In Vitro Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microflora." *European Journal of Nutrition* 44 (3): 133–42. doi:10.1007/s00394-004-0502-2.
- Aura, Anna-Marja, Ismo Mattila, Tuulia Hyötyläinen, Peddinti Gopalacharyulu, Veronique Cheynier, Jean-Marc Souquet, Magali Bes, Carine Le Bourvellec, Sylvain Guyot, and Matej Orešič. 2012. "Characterization of Microbial Metabolism of Syrah Grape Products in an in Vitro Colon Model Using Targeted and Non-Targeted Analytical Approaches." *European Journal of Nutrition* 52 (2): 833–46. doi:10.1007/s00394-012-0391-8.
- Aviram, Michael, and Bianca Fuhrman. 2002. "Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 957 (1): 146–61. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02913.x.
- Bellik, Yuva., Laïd. Boukraâ, Hasan A Alzahrani, Balkees A Bakhotmah, Fatiha. Abdellah, Si M Hammoudi, and Mokrane. Iguer-Ouada. 2012. "Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update." *Molecules (Basel, Switzerland)* 18 (1): 322–53. doi:10.3390/molecules18010322.
- Boersma, Marelle G, Hester Van der Woude, Jan Bogaards, Sjef Boeren, Jacques Vervoort, Nicole H P Cnubben, Marlou L P S Van Iersel, Peter J Van Bladeren, and Ivonne M C M Rietjens. 2002. "Regioselectivity of Phase II Metabolism of Luteolin and Quercetin by UDP-Glucuronosyl Transferases." *Chemical Research in Toxicology* 15 (5): 662–70. doi:10.1021/tx0101705.
- Bravo, Laura. 1998. "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance." *Nutrition Reviews* 56 (11): 317–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838798.

- Cervantes-Laurean, Daniel, Derek D Schramm, Elaine L Jacobson, Ihab Halaweish, Geza G Bruckner, and Gilbert a Boissonneault. 2006. "Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation on Collagen by Rutin and Its Metabolites." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17 (8): 531–40. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.10.002.
- Clifford, M N. 2004. "Diet-Derived Phenols in Plasma and Tissues and Their Implications for Health." *Planta Medica* 70 (12): 1103–14. doi:10.1055/s-2004-835835.
- Cooper, Karen a, Jennifer L Donovan, Andrew L Waterhouse, and Gary Williamson. 2008. "Cocoa and Health: A Decade of Research." *The British Journal of Nutrition* 99 (1): 1–11. doi:10.1017/S0007114507795296.
- Corti, Roberto, Andreas J Flammer, Norman K Hollenberg, and Thomas F Lüscher. 2009. "Cocoa and Cardiovascular Health." *Circulation* 119 (10): 1433–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827022.
- Das, N P, and S P Sothy. 1971. "Studies on Flavonoid Metabolism." *Biochem J* 125: 417–23. file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Das, Sothy - 1971 - Studies on Flavonoid Metabolism.pdf.
- Day, A J, F J Cañada, J C Díaz, P A Kroon, R Mclauchlan, C B Faulds, G W Plumb, M R Morgan, and G Williamson. 2000. "Dietary Flavonoid and Isoflavone Glycosides Are Hydrolysed by the Lactase Site of Lactase Phlorizin Hydrolase." *FEBS Letters* 468 (2–3): 166–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692580>.
- Del Rio, Daniele, Ana Rodriguez-Mateos, Jeremy P E Spencer, Massimiliano Tognolini, Gina Borges, and Alan Crozier. 2013. "Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects against Chronic Diseases." *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (14): 1818–92. doi:10.1089/ars.2012.4581.
- Déprez, S, C Brezillon, S Rabot, C Philippe, I Mila, C Lapierre, and a Scalbert. 2000. "Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids." *The Journal of Nutrition* 130 (11): 2733–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053514>.
- Ding, Eric L, Susan M Hutfless, Xin Ding, and Saket Girotra. 2006. "Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review." *Nutrition & Metabolism* 3 (2): 1–12. doi:10.1186/1743-7075-3-2.
- Donovan, Jennifer L, Jennifer R Bell, Sidika Kasim-karakas, J Bruce German, Rosemary L Walzem, Robert J Hansen, and Andrew L Waterhouse. 1999. "Human Nutrition and Metabolism Catechin Is Present as Metabolites in Human Plasma after Consumption of." *The Journal of Nutrition* 129 (June): 1662–68. file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Donovan et al. - 1999 - Human Nutrition and Metabolism Catechin Is Present as Metabolites in Human Plasma after Consumption of.pdf.
- Dorenkott, Melanie R, Laura E Gri, Katheryn M Goodrich, Katherine A Thompson-witrick, Gabrielle Fundaro, Liyun Ye, Joseph R Stevens, et al. 2014. "Oligomeric Cocoa Procyanidins Possess Enhanced Bioactivity Compared to Monomeric and Polymeric Cocoa Procyanidins for Preventing the Development of Obesity, Insulin Resistance, and Impaired Glucose Tolerance during High-Fat Feeding." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 2216–27. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/2014, Dorenott. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance.pdf.
- Dorsten, F A Van, S Peters, G Gross, M Klinkenberg, R C De Vos, E E Vaughan, J P Van Duynhoven, S Possemiers, and D M Jacobs. 2012. "Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent." file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Microflora/2012, Van Dorsten. Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine-grape juice is source-specific and colon-region dependent.pdf.
- EFSA. 2012. "Scientific Opinion on the Substantiation of a Health Claim Related to Cocoa Flavanols and Maintenance of Normal Endothelium-Dependent Vasodilation pursuant to Article 13 (5) of Regulation

- (EC) No 1924 / 2006 1." *Journal, EFSA* 10 (7): 1–21. doi:10.2903/j.efsa.2012.2809.
- Falany, C N. 1997. "Enzymology of Human Cytosolic Sulfotransferases." *The FASEB Journal* 11: 206–16. doi:10.1016/0165-6147(91)90566-B.
- Felgines, Catherine, Marie-paule Gonthier, Odile Texier, Augustin Scalbert, Jean-louis Lamaison, and Christian Re. 2003. "Human Nutrition and Metabolism Strawberry Anthocyanins Are Recovered in Urine as Glucuro- and Sulfoconjugates in Humans," no. January: 1296–1301. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Felgines et al. - 2003 - Human Nutrition and Metabolism Strawberry Anthocyanins Are Recovered in Urine as Glucuro- and Sulfoconjugates i.pdf.
- Fogliano, Vincenzo, Maria Laura Corollaro, Paola Vitaglione, Aurora Napolitano, Rosalia Ferracane, Fabiano Travaglia, Marco Arlorio, Adele Costabile, Annett Klinder, and Glenn Gibson. 2011. "In Vitro Bioaccessibility and Gut Biotransformation of Polyphenols Present in the Water-Insoluble Cocoa Fraction." *Molecular Nutrition & Food Research* 55 Suppl 1 (May): S44-55. doi:10.1002/mnfr.201000360.
- Garcia-Salas, Patricia, Aranzazu Morales-Soto, Antonio Segura-Carretero, and Alberto Fernández-Gutiérrez. 2010. "Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples." *Molecules* 15 (12): 8813–26. doi:10.3390/molecules15128813.
- Ghiselli, A, F Natella, A Guidi, L Montanari, P Fantozzi, and C Scaccini. 2000. "Beer Increases Plasma Antioxidant Capacity in Humans." *J Nutr Biochem* 11 (2): 76–80. doi:10.1016/S0955-2863(99)00077-7.
- Glässer, G, E U Graefe, F Struck, M Veit, and R Gebhardt. 2002. "Comparison of Antioxidative Capacities and Inhibitory Effects on Cholesterol Biosynthesis of Quercetin and Potential Metabolites." *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 9 (1): 33–40. doi:10.1078/0944-7113-00080.
- Gonthier, M-P, C Remesy, a Scalbert, V Cheynier, J-M Souquet, K Poutanen, and a-M Aura. 2006. "Microbial Metabolism of Caffeic Acid and Its Esters Chlorogenic and Caftaric Acids by Human Faecal Microbiota in Vitro." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie* 60 (9): 536–40. doi:10.1016/j.biopha.2006.07.084.
- Gonthier, Marie-Paule, Jennifer L Donovan, Odile Texier, Catherine Felgines, Christian Remesy, and Augustin Scalbert. 2003. "Metabolism of Dietary Procyanidins in Rats." *Free Radical Biology and Medicine* 35 (8): 837–44. doi:10.1016/S0891-5849(03)00394-0.
- Gonthier, Marie Paule, Marie Anne Verny, Catherine Besson, Christian Rémésy, and Augustin Scalbert. 2003. "Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats." *The Journal of Nutrition* 133 (6): 1853–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771329>.
- Griffiths, L A, and G E Smith. 1972. "Metabolism of Myricetin and Related Compounds in the Rat. Metabolite Formation in Vivo and by the Intestinal Microflora in Vitro." *The Biochemical Journal* 130 (1): 141–51. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1174309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gross, Gabriele, Doris M Jacobs, Sonja Peters, Sam Possemiers, John van Duynhoven, Elaine E Vaughan, and Tom van de Wiele. 2010. "In Vitro Bioconversion of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/grape Juice by Human Intestinal Microbiota Displays Strong Interindividual Variability." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (18): 10236–46. doi:10.1021/jf101475m.
- Gross, M, M Pfeiffer, M Martini, Myron Gross, Michelle Pfeiffer, Margaret Martini, Deborah Campbell, Joanne Slavin, and John Potter. 1996. "The Quantitation of Metabolites of Quercetin Flavonols in Human Urine . The Quantitation of Metabolites of Quercetin Flavonols in Human Urine " 2." *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 5: 711–20. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Gross et al. - 1996 - The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine . The Quantitation of Metabolites of Quercet.pdf.
- Gu, Liwei, Mark Kelm, John F Hammerstone, Gary Beecher, Joanne Holden, David Haytowitz, Susan Gebhardt, and Ronald L Prior. 2004. "Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and

- Estimations of Normal Consumption." *The Journal of Nutrition* 134: 613–17. doi:10.1016.
- Hammerstone, John F, Sheryl A Lazarus, Alyson E Mitchell, Robert Rucker, and Harold H Schmitz. 1999. "Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma Cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry." *J. Agric. Food Chem.* 47: 490–96. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Articulos/Flavonoides ref/Procyanidinas/1999, Hammerstone. Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.pdf.
- Hermann, F, L E Spieker, F Ruschitzka, I Sudano, M Hermann, C Binggeli, T F Lüscher, W Riesen, G Noll, and R Corti. 2006. "Dark Chocolate Improves Endothelial and Platelet Function." *Heart (British Cardiac Society)* 92 (1): 119–20. doi:10.1136/hrt.2005.063362.
- Holt, Roberta R, Sheryl A Lazarus, M Cameron Sullards, Qin Yan Zhu, Derek D Schramm, John F Hammerstone, Cesar G Fraga, Harold H Schmitz, and Carl L Keen. 2002. "Procyanidin Dimer B2 [Epicatechin- (4B-8)- Epicatechin] in Human Plasma after the Consumption of a Flavanol-Rich Cocoa." *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 798–804.
- Jiménez-Vera, Román, Oscar Monroy, Alma Corona-Cruz, and Mariano García-Garibay. 2008. "Construction of a Model of the Human Proximal Colon." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (12): 2767–74. doi:10.1007/s11274-008-9803-6.
- Kleessen, Brigitta, Eugenia Bezirtzoglou, and Jaana Matto. 2000. "Culture-Based Knowledge on Biodiversity , Development and Stability of Human Gastrointestinal Microflora." *Microb Ecol Health Dis* 2: 53–63. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Kleessen Brigitta - 2000 - Culture-Based Knowledge on Biodiversity , Development and Stability of Human Gastrointestinal Micro ora.pdf.
- Kurowska, Elzbieta M, and John a Manthey. 2004. "Hypolipidemic Effects and Absorption of Citrus Polymethoxylated Flavones in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (10): 2879–86. doi:10.1021/jf035354z.
- Latif, R. 2013. "Chocolate / Cocoa and Human Health : A Review." *The Journal of Medicine* 71 (2): 63–68. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Articulos/Flavonoides ref/Cacao/2013, Latif. Chocolate-cocoa and human health a review..pdf.
- Lotito, Silvina B, and Balz Frei. 2006. "Consumption of Flavonoid-Rich Foods and Increased Plasma Antioxidant Capacity in Humans: Cause, Consequence, or Epiphenomenon?" *Free Radical Biology & Medicine* 41 (12): 1727–46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.
- Macfarlane, George T, and Sandra Macfarlane. 2007. "Models for Intestinal Fermentation: Association between Food Components, Delivery Systems, Bioavailability and Functional Interactions in the Gut." *Current Opinion in Biotechnology* 18 (2): 156–62. doi:10.1016/j.copbio.2007.01.011.
- Manach, Claudine, Gary Williamson, Christine Morand, and Augustin Scalbert. 2005. "Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans . Review of 97 Bioavailability Studies." *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230–42. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Articulos/Flavonoides ref/2005-Manach. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.pdf.
- Margalef, Maria, Zara Pons, Francisca Isabel Bravo, Begoña Muguerza, and Anna Arola-Arnal. 2015. "Plasma Kinetics and Microbial Biotransformation of Grape Seed Flavanols in Rats." *Journal of Functional Foods* 12 (January). Elsevier Ltd: 478–88. doi:10.1016/j.jff.2014.12.007.
- Margalef, Maria, Zara Pons, Begoña Muguerza, and Anna Arola-Arnal. 2014. "A Rapid Method to Determine Colonic Microbial Metabolites Derived from Grape Flavanols in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (31): 7698–7706. doi:10.1021/jf5019752.
- Martínez-Flórez, S, J González-Gallego, M Culebras, and M J Tuñón. 2002. "Los Flavonoides : Propiedades Y Acciones Antioxidantes." *Nutrición Hospitalaria* 17 (6): 271–78. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/S. Martínez-

- Flórez, J. González-Gallego - 2002 - Los flavonoides propiedades y acciones antioxidantes.pdf.
- Meng, Xiaofeng, Shengmin Sang, Nanqun Zhu, Hong Lu, Shuqun Sheng, Mao-Jung Lee, Chi-Tang Ho, and Chung S Yang. 2002. "Identification and Characterization of Methylated and Ring-Fission Metabolites of Tea Catechins Formed in Humans, Mice, and Rats." *Chemical Research in Toxicology* 15 (8): 1042–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184788>.
- Meselhy, M R, N Nakamura, and Hattori M. 1997. "Biotransformation of (-)-Epicatechin 3-O-Gallate by Human Intestinal Bacteria." *Chem. Pharm. Bull.* 45 (1): 888–93. [file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Meselhy M. R. - 1997 - Biotransformation of \(-\)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria.pdf](file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Meselhy M. R. - 1997 - Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria.pdf).
- Monagas, María, Nasiruddin Khan, Cristina Andrés-Lacueva, Mireia Urpí-Sardá, Mónica Vázquez-Agell, Rosa María Lamuela-Raventós, and Ramón Estruch. 2009. "Dihydroxylated Phenolic Acids Derived from Microbial Metabolism Reduce Lipopolysaccharide-Stimulated Cytokine Secretion by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *The British Journal of Nutrition* 102 (2): 201–6. doi:10.1017/S0007114508162110.
- Monagas, Maria, Mireia Urpi-Sarda, Fernando Sánchez-Patán, Rafael Llorach, Ignacio Garrido, Carmen Gómez-Cordovés, Cristina Andres-Lacueva, and Begoña Bartolomé. 2010. "Insights into the Metabolism and Microbial Biotransformation of Dietary Flavan-3-Ols and the Bioactivity of Their Metabolites." *Food & Function* 1 (3): 233–53. doi:10.1039/c0fo00132e.
- Morris, Martha Clare, Denis A Evans, Julia L Bienias, Christine C Tangney, David A Bennett, Robert S Wilson, and Paul A Scherr. 2002. "Dietary Intake of Antioxidant Nutrients and the Risk of Incident Alzheimer Disease in a Biracial Community Study." *American Medical Association* 287 (24): 3231–37. <file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Morris et al. - 2002 - Dietary Intake of Antioxidant Nutrients and the Risk of Incident Alzheimer Disease in a Biracial Community Study.pdf>.
- Mosele, Juana I, Sandra Martín-Peláez, Alba Macià, Marta Farràs, Rosa-Maria Valls, Ursula Catalán, and María-José Motilva. 2014. "Faecal Microbial Metabolism of Olive Oil Phenolic Compounds: In Vitro and in Vivo Approaches." *Molecular Nutrition & Food Research*, July, 1–11. doi:10.1002/mnfr.201400124.
- Mun, Irene., Maria. Monagas, Pedro J Mart, Mora. Murri, Francisco J Tinahones, Cristina. Andre, and Begon. Bartolome. 2013. "Comparative Study of Microbial-Derived Phenolic Metabolites in." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3909–15. <file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Mun et al. - 2013 - Comparative Study of Microbial-Derived Phenolic Metabolites in.pdf>.
- Natsume, Midori, Naomi Osakabe, Makoto Oyama, Motoko Sasaki, Seigo Baba, Yoshimasa Nakamura, Toshihiko Osawa, and Junji Terao. 2003. "Structures of (-)-Epicatechin Glucuronide Identified from Plasma and Urine after Oral Ingestion of (-)-Epicatechin: Differences between Human and Rat." *Free Radical Biology and Medicine* 34 (7): 840–49. doi:10.1016/S0891-5849(02)01434-X.
- Németh, Kitty, Geoff W Plumb, Jean-Guy Berrin, Nathalie Juge, Ralf Jacob, Hassan Y Naim, Gary Williamson, Dallas M Swallow, and Paul a Kroon. 2003. "Deglycosylation by Small Intestinal Epithelial Cell Beta-Glucosidases Is a Critical Step in the Absorption and Metabolism of Dietary Flavonoid Glycosides in Humans." *European Journal of Nutrition* 42 (1): 29–42. doi:10.1007/s00394-003-0397-3.
- Olthof, Margreet R, Peter C H Hollman, Michel N C P Buijsman, Johan M M Van Amelsvoort, and Martijn B Katan. 2003. "Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid , Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans." *Journal Of Nutrition* 133 (October 2002): 1806–14. <file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Articulos/Flavonoides ref/2003-Olthof. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans.pdf>.
- Ou, Keqin, Paul Sarnoski, Keith R Schneider, Kaijie Song, Christina Khoo, and Liwei Gu. 2014. "Microbial Catabolism of Procyanidins by Human Gut Microbiota." *Molecular Nutrition & Food Research*, July, 1–10. doi:10.1002/mnfr.201400243.

- Parkar, Shanthi G, Tania M Trower, and David E Stevenson. 2013. "Fecal Microbial Metabolism of Polyphenols and Its Effects on Human Gut Microbiota." *Anaerobe* 23 (October). Elsevier Ltd: 12–19. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.07.009.
- Peppercorn, Mark A, and Peter Goldman. 1971. "Caffeic Acid Metabolism by Bacteria of the Human Gastrointestinal Tract Caffeic Acid Metabolism by Bacteria of the Human Gastrointestinal Tract." *J Bacteriol* 108 (3): 996–1000. file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Peppercorn, Goldman - 1971 - Caffeic Acid Metabolism by Bacteria of the Human Gastrointestinal Tract Caffeic Acid Metabolism by Bacteria.pdf.
- "Prevención de Las Enfermedades Cardiovasculares Guía de Bolsillo Para La Estimación." 2008. *Organización Mundial de La Salud Y La Sociedad Internacional de Hipertensión. Prevención de Las Enfermedades Cardiovasculares: Guía de Bolsillo Para La Estimación Y El Manejo Del Riesgo Cardiovascular. Organización Mundial de La Salud, Suiza.*
- Rechner, Andreas R, Martin A Smith, Gunter Kuhnle, Glenn R Gibson, Edward S Debnam, Kaila S Srai, Kevin P Moore, and Catherine A Rice-Evans. 2004. "Colonic Metabolism of Dietary Polyphenols: Influence of Structure on Microbial Fermentation Products." *Free Radical Biology and Medicine* 36 (2): 212–25. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022.
- Rietveld, Anton, and Sheila Wiseman. 2003. "Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health : Role of Flavonoids in the Diet Antioxidant Effects of Tea : Evidence from Human Clinical Trials." *The Journal of Nutrition* 133: 3285–92. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/2003-Rietveld-Antioxidant effects of tea, evidence from human clinical trials.pdf.
- Rios, Laurent Y, Richard N Bennett, Sheryl A Lazarus, Christian Rémésy, Augustin Scalbert, and Gary Williamson. 2002. "Cocoa Procyanidins Are Stable during Gastric Transit in Humans 1 – 3." *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 1106–10. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/Procianidinas/2002, Rios. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans.pdf.
- Rios, Laurent Y, Marie-Paule Gonthier, Christian Rémésy, Isabelle Mila, Catherine Lapierre, Sheryl a Lazarus, Gary Williamson, and Augustin Scalbert. 2003. "Chocolate Intake Increases Urinary Excretion of Polyphenol-Derived Phenolic Acids in Healthy Human Subjects." *The American Journal of Clinical Nutrition* 77 (4): 912–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663291>.
- Robbins, Rebecca J., Jadwiga Leonczak, Julia Li, J. Christopher Johnson, Tom Collins, Catherine Kwik-Uribe, and Harold H. Schmitz. 2012. "Determination of Flavanol and Procyanidin (by Degree of Polymerization 1–10) Content of Chocolate, Cocoa Liquors, Powder(s), and Cocoa Flavanol Extracts by Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography: Collaborative Study." *Journal of AOAC International*. doi:10.5740/jaoacint.12-162.
- RR, Scheline. 1970. "The Metabolism of (+) -Catechin to Hydroxyphenylvaleric Acids by the Intestinal Microflora." *Biochim Biophys Acta* 222: 228–30. file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/RR - 1970 - The metabolism of () -catechin to hydroxyphenylvaleric acids by the intestinal microflora.pdf.
- Rusconi, M, and A Conti. 2010. "Theobroma Cacao L., the Food of the Gods: A Scientific Approach beyond Myths and Claims." *Pharmacological Research* 61 (1): 5–13. doi:10.1016/j.phrs.2009.08.008.
- Salminen, S, C Bouley, M.-C. Boutron-Ruault, J H Cummings, A Franck, G R Gibson, E Isolauri, M C Moreau, M Roberfroid, and I Rowland. 1998. "Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function." *British Journal of Nutrition* 80 (Suppl): 147–71. file:///C:/Users/siuadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Salminen et al. - 1998 - Functional food science and gastrointestinal physiology and function.pdf.
- Sánchez-Patán, Fernando, Carolina Cueva, Maria Monagas, Gemma E Walton, Glenn R M Gibson, Jesús E Quintanilla-López, Rosa Lebrón-Aguilar, P J Martín-Álvarez, M Victoria Moreno-Arribas, and Begoña Bartolomé. 2012. "In Vitro Fermentation of a Red Wine Extract by Human Gut Microbiota: Changes in

- Microbial Groups and Formation of Phenolic Metabolites." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (9): 2136–47. doi:10.1021/jf2040115.
- Saura-Calixto, Fulgencio. 2012. "Concept and Health-Related Properties of Nonextractable Polyphenols: The Missing Dietary Polyphenols." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (45): 11195–200. doi:10.1021/jf303758j.
- Scalbert, Augustin, and Gary Williamson. 2000. "Chocolate : Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols 1," 2073–85. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Scalbert, Williamson - 2000 - Chocolate Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polypheno.pdf.
- Schramm, D D, J F Wang, R R Holt, J L Ensunsa, J L Gonsalves, S a Lazarus, H H Schmitz, J B German, and C L Keen. 2001. "Chocolate Procyanidins Decrease the Leukotriene Prostacyclin Ratio in Humans and Human Aortic Endothelial Cells." *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 36–40. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/Cacao/2001, Schramm. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells.pdf.
- Schroeter, Hagen, Christian Heiss, Jan Balzer, Petra Kleinbongard, Carl L Keen, Norman K Hollenberg, Helmut Sies, Catherine Kwik-Urbe, Harold H Schmitz, and Malte Kelm. 2006. "(-)-Epicatechin Mediates Beneficial Effects of Flavanol-Rich Cocoa on Vascular Function in Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (4): 1024–29. doi:10.1073/pnas.0510168103.
- Selma, María V, Juan C Espín, and Francisco a Tomás-Barberán. 2009. "Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15): 6485–6501. doi:10.1021/jf902107d.
- Stoupi, Stavroula, Gary Williamson, J Warren Drynan, Denis Barron, and Michael N Clifford. 2010. "Procyanidin B2 Catabolism by Human Fecal Microflora : Partial Characterization of ' Dimeric ' Intermediates." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501 (1). Elsevier Inc.: 73–78. doi:10.1016/j.abb.2010.02.009.
- Takagaki, Akiko, and Fumio Nanjo. 2013. "Catabolism of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin by Rat Intestinal Microbiota." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (20): 4927–35. doi:10.1021/jf304431v.
- Testing, Formulation. n.d. "TIM Gastrointestinal Models." file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Testing - Unknown - TIM gastrointestinal models.pdf.
- Tilgmann, Carola, and Ismo Ulmanen. 1996. "Purification Methods of Mammalian Catechol-O-Methyltransferase." *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 684: 147–61. doi:10.1016/0378-4347(96)00117-X.
- Tzounis, Xenofon, Jelena Vulevic, Gunter G C Kuhnle, Trevor George, Jadwiga Leonczak, Glenn R Gibson, Catherine Kwik-Urbe, and Jeremy P E Spencer. 2008. "Flavanol Monomer-Induced Changes to the Human Faecal Microflora." *The British Journal of Nutrition* 99 (4): 782–92. doi:10.1017/S0007114507853384.
- U.S. Department of Health and Human services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), and Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001. "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation."
- Urpi-Sarda, Mireia, Maria Monagas, Nasiruddin Khan, Rosa M Lamuela-Raventos, Celestino Santos-Buelga, Emilio Sacanella, Margarida Castell, Joan Permanyer, and Cristina Andres-Lacueva. 2009. "Epicatechin, Procyanidins, and Phenolic Microbial Metabolites after Cocoa Intake in Humans and Rats." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (6): 1545–56. doi:10.1007/s00216-009-2676-1.
- Urpi-Sarda, Mireia, María Monagas, Nasiruddin Khan, Rafael Llorach, Rosa Ma Lamuela-Raventós, Olga Jáuregui, Ramón Estruch, María Izquierdo-Pulido, and Cristina Andrés-Lacueva. 2009. "Targeted Metabolic Profiling of Phenolics in Urine and Plasma after Regular Consumption of Cocoa by Liquid

- Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography. A* 1216 (43): 7258–67. doi:10.1016/j.chroma.2009.07.058.
- Valenzuela, Alfonso. 2007. "El Chocolate, Un Placer Saludable." *Revista Chilena de Nutrición* 34 (3): 0–20. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/Procianidinas/Valenzuela 2007. El chocolate, un placer saludable.pdf.
- Vardakou, Maria, Carmen Nueno Palop, Michael Gasson, Arjan Narbad, and Paul Christakopoulos. 2007. "In Vitro Three-Stage Continuous Fermentation of Wheat Arabinoxylan Fractions and Induction of Hydrolase Activity by the Gut Microflora." *International Journal of Biological Macromolecules* 41 (5): 584–89. doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.07.017.
- Vitaglione, Paola, Giovanna Donnarumma, Aurora Napolitano, Fabio Galvano, Assunta Gallo, Luca Scalfi, and Vincenzo Fogliano. 2007. "Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides." *The Journal of Nutrition* 137 (April): 2043–48. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Vitaglione et al. - 2007 - Protocatechuic Acid Is the Major Human.pdf.
- Walle, Thomas, Alyson M Browning, Lisa L Steed, Susan G Reed, and U Kristina Walle. 2005. "Human Nutrition and Metabolism Flavonoid Glucosides Are Hydrolyzed and Thus Activated in the Oral Cavity," no. August 2004: 48–52. file:///C:/Users/siadmin/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Walle et al. - 2005 - Human Nutrition and Metabolism Flavonoid Glucosides Are Hydrolyzed and Thus Activated in the Oral Cavity.pdf.
- Wan, Ying, Joe A Vinson, Terry D Etherton, John Proch, Sheryl A Lazarus, and Penny M Kris-etherton. 2001. "Effects of Cocoa Powder and Dark Chocolate on LDL Oxidative Sus- Ceptibility and Prostaglandin Concentrations in Humans 1 – 3." *The American Journal of Clinical Nutrition* 74: 596–602. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/Cacao/2001-Wan. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concen- trations in humans.pdf.
- Weaver, G a, J a Krause, T L Miller, and M J Wolin. 1989. "Constancy of Glucose and Starch Fermentations by Two Different Human Faecal Microbial Communities." *Gut* 30 (1): 19–25. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1378224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wollgast, Jan, and Elke Anklam. 2000. "Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition during the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification." *Food Research International* 33: 423–47. file:///C:/Users/Public/Documents/Diana/Maestria/TESIS 1/Artículos/Flavonoides ref/Procianidinas/2000, Wollgast. Review on polyphenols in Theobroma cacao, changes in composition.pdf.
- Wu, Chi-Hao, Cheng-Feng Wu, Hsiao-Wen Huang, Ya-Chien Jao, and Gow-Chin Yen. 2009. "Naturally Occurring Flavonoids Attenuate High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokines in Human Monocytic THP-1 Cells." *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (8): 984–95. doi:10.1002/mnfr.200800495.
- Yuan, Jian-Ping, Jiang-Hai Wang, and Xin Liu. 2007. "Metabolism of Dietary Soy Isoflavones to Equol by Human Intestinal Microflora--Implications for Health." *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (7): 765–81. doi:10.1002/mnfr.200600262.
- Zihler Berner, Annina, Susana Fuentes, Alexandra Dostal, Amanda N Payne, Pamela Vazquez Gutierrez, Christophe Chassard, Franck Grattepanche, Willem M de Vos, and Christophe Lacroix. 2013. "Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for Controlled Ecological Studies: Validation and Effect of pH." *PloS One* 8 (10): e77772–e77772. doi:10.1371/journal.pone.0077772.