



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios de absorción y disposición de naringenina y quercetina. Estudios preclínicos.

Naiara Orrego Lagarón



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Unidad de
Biofarmacia y Farmacocinética.

Título: Estudios de absorción y disposición de naringenina y quercetina.
Estudios preclínicos.

Naiara Orrego Lagarón

2016

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Unidad de
Biofarmacia y Farmacocinética
Programa de doctorado
Investigación, Desarrollo y Control de Medicamentos
2011-2016

Título: Estudios de absorción y disposición de naringenina y quercetina.
Estudios preclínicos.

Memoria presentada por Naiara Orrego Lagarón para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona, dirigida por:

Dra. Elvira Escribano Ferrer

Dra. Rosa María Lamuela Raventós

Naiara Orrego Lagarón

Naiara Orrego Lagarón

2016

FINANCIACIÓN

 <p>UNIVERSITAT DE BARCELONA</p>	<p>Universidad de Barcelona</p>
 <p>Instituto de Salud Carlos III</p>	<p>Instituto de Salud Carlos III</p>
 <p><i>Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición</i></p>	<p>Centros de Investigaciones Biomédicas en Red, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición. CIBEROBn CB06/03 es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.</p>
 <p>GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD</p> <p>SECRETARÍA DE ESTADO DE INVESTIGACION, DESARROLLO E INNOVACION</p>	<p>Ministerio de Economía y Competitividad. Red de grupo G03/140 AGL2010-22319-C03 y AGL2013-49083-C3-1-R</p>
 <p>POLYPHENOL RESEARCH</p>	<p>Grupo Antioxidantes Naturales.</p>
 <p>Generalitat de Catalunya</p>	<p>Generalitat de Catalunya 2014 SGR 773</p>

AGRADECIMIENTOS

*Primero de todo, agradecerles a mis directoras de tesis, Elvira y Rosa, no sólo por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, sino también por el apoyo y la confianza depositada en mí. Su entrega en cada una de las fases de la investigación, **MUCHAS GRACIAS**.*

***GRACIAS** al grupo antioxidantes naturales por facilitarme la integración en el departamento y por hacerme sentir una más durante todo este tiempo. Por ser mis maestros, por poder compartir con vosotros esta experiencia y por hacerla más llevadera.*

*Miriam, Anna...no tengo palabras para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí durante todo este tiempo, incluidos los cafés y las grandes charlas, y sobre todo, por creer en mí y acompañarme. **MIL GRACIAS Y MÁS**.*

***GRACIAS** a todos los que de una manera u otra habéis soportado la palabra: tesis, infinita y alguna más, incluso un sábado a la noche o un domingo a la mañana; Laura, Mariangeles, Palmi, Esther, Nuri, Mariel, Eze, Jess, Sandra, y un largo etcétera. A todos los que habéis recorrido este camino junto a mí desde el día uno de esta aventura, todos tenéis un poco de culpa de que haya llegado hasta aquí.*

***GRACIAS** Font Pi por darme tan buenos momentos, tener paciencia y ayudarme en este largo camino. No sólo a Bego, Santi y Laura sino a todos mis vecinos favoritos, siempre atentos y preguntándome cómo va el “doctorado, la tesis”...No lo sabéis pero habéis sido una parte muy importante durante este camino.*

***GRACIAS** Dra. Eugenia, gracias por estar ahí siempre, por darme consejos, por enseñarme como al final siempre llega la calma y el éxito.*

***GRACIAS** futuro Dr. Moreno, espero que no te incomode que te llame “luciérnaga” pero para mi tú has sido la mía. Por supuesto, al resto de componentes de la banda de ático de Calabria **GRACIAS GUYS**, I would not be here without you.*

***GRACIAS** familia, ya sabéis que soy más de hechos que de palabras.*

***DANKYU** roomies el mejor año sin duda! Lo estamos consiguiendo!*

***DANKE**, du weisst, wenn eine Tür schliesst, öffnet sich eine Andere.*

ESKERRIK ASKO

MERÇI



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LADME de principios activos administrados por vía oral	2
1.1. Liberación.....	3
1.2. Absorción.....	5
1.2.1. Factores fisiológicos.....	5
1.2.2. Factores que dependen del principio activo.....	11
1.3. Distribución	14
1.4. Metabolismo	15
1.5. Excreción.....	21
2. Absorción y biodisponibilidad	25
3. Coeficiente de permeabilidad efectivo: fundamento y métodos de estudio.....	28
4. El tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	35
4.1. Historia, consumo y producción.....	35
4.2. Composición y valor nutricional.....	36
4.3. Compuestos bioactivos	36
5. Naringenina y Quercetina	42
5.1. Características físico-químicas de la naringenina y la quercetina	42
5.2. Farmacocinética de la naringenina y de la quercetina	43
5.3. Actividad farmacológica y efectos bioactivos de la naringenina y la quercetina	48
6. Análisis e identificación de compuestos fenólicos y sus metabolitos	52
6.1. Cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV).....	52
6.2. Cromatografía líquida de alta resolución con detección de espectrometría de masas (HPLC-MS).....	55
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	59
1. Hipótesis	59
2. Objetivos	61
III. RESULTADOS.....	65
Publicación 1.....	65

Publicación 2.....	79
Publicación 3.....	89
IV.DISCUSIÓN GENERAL	115
V.CONCLUSIONES.....	131
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	135
VIII.ANEXOS	159
1.Abreviaturas	159
2. Estudio de la dieta exenta de polifenoles y curva peso/día de los animales.....	162
3. Ácido clorogénico: estabilidad y permeabilidad gástrica.....	163
4. Comunicaciones en congresos	165



I. INTRODUCCIÓN

Proveniente de los países mediterráneos (España, Italia, Grecia...), el concepto de dieta mediterránea fue desarrollado en los años cincuenta, consolidándose en la actualidad en una serie de características como son: un mayor consumo de aceite de oliva, cereales, legumbres, frutas y hortalizas y un bajo consumo de carnes rojas y de grasas de origen animal. Estudios recientes han observado como aquellas poblaciones que basan su alimentación en el mayor consumo de frutas y hortalizas sufren menos incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes, o lo que es lo mismo, tienen un índice de mortalidad menor que aquellos países en los que esta dieta esta menos arraigada (países del norte de Europa o Estados Unidos). Tal es así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS), los organismos de Salud Pública y los profesionales de la nutrición se han comprometido en la tarea de promover el consumo de la dieta mediterránea como medio para racionalizar nuestros hábitos alimentarios y volverlos más saludables (León Espinosa de los Monteros y Castillo Sánchez, 2002).

Debido a la relación “Dieta mediterránea vs. Salud”, se han promovido estudios de los compuestos bioactivos que se encuentran en frutas y hortalizas, con el fin de conocer las causas de los efectos beneficiosos que presenta la dieta mediterránea sobre la salud.

Dentro de este contexto se enmarca la presente tesis doctoral que se centra en el estudio de una de las hortalizas más consumidas en Europa y más concretamente en los países mediterráneos: el tomate. Los tomates destacan por su elevado contenido en carotenos, ácido ascórbico, vitamina E y compuestos fenólicos. Los flavonoides son los compuestos fenólicos mayoritarios del tomate. Muchos artículos señalan a los flavonoides como los responsables del efecto beneficioso en la salud del tomate, previniendo y mejorando enfermedades tan importantes como cáncer, enfermedades cardiovasculares y/o metabólicas. La naringenina constituye el principal flavonoide del tomate (45%), seguido de la quercetina (39%), y por ello son los principales compuestos de estudio de esta tesis. Aunque la naringenina y la quercetina se señalan como los principales responsables de los efectos fisiológicos del tomate, su baja biodisponibilidad oral (10% para la naringenina y 0.004-0.1% para la quercetina) suscita muchas dudas respecto a su implicación real en dichas acciones biológicas, ya que sus posibles efectos saludables suelen estar directamente relacionados con la biodisponibilidad de dichos compuestos activos.

La biodisponibilidad oral depende básicamente de la permeabilidad del compuesto en el lugar de absorción, del efecto metabólico que sufre a nivel intestinal y hepático, y de la influencia de la microflora intestinal, entre otros. Hasta la fecha, no se conocen estudios que engloben el estudio de la biodisponibilidad de la naringenina en todo el tracto gastrointestinal, y que

Introducción.....

informen acerca de los factores que afectan a su permeabilidad intestinal y/o el metabolismo incluyendo la influencia de la microbiota intestinal.

Además, los flavonoides y en particular la naringenina se consumen gracias a la ingesta de alimentos con lo que, normalmente se consumen junto con otros flavonoides. En el presente trabajo, dado que el segundo flavonoide mayoritario del tomate es la quercetina, se ha estudiado cómo afecta a la disposición de la naringenina su coadministración con quercetina.

La presente tesis doctoral se enmarca dentro de un proyecto de investigación más amplio que lleva por título “*Evaluación de la ingesta de diferentes dosis de tomate sobre la presión arterial y la función endotelial en pacientes de alto riesgo vascular, efecto nutrigenómico sobre los fenotipos de riesgo (AGL2010-22319-C03)*”, cuya finalidad global es la de evaluar los efectos de las diferentes dosis de tomate para definir una dosis efectiva y capaz de disminuir la presión arterial y vascular.

1. LADME de principios activos administrados por vía oral

Los procesos que sufre un fármaco y/o compuesto bioactivo desde su administración por vía oral hasta su eliminación del organismo, se pueden explicar mediante el anagrama de LADME (**figura 1.1**). El LADME implica la **(L) liberación** del principio activo de la matriz que lo contiene y su posterior disolución en el medio acuoso intestinal, para proceder a la **(A) absorción** del mismo a través de las membranas celulares hacia la circulación sistémica, donde se **(D) distribuye** a todos los órganos y tejidos irrigados. Durante todo este camino el compuesto bioactivo puede sufrir **(M) metabolismo** por parte de los enzimas que se encuentran en los órganos que atraviesa. Finalmente se **(E) excreta** del organismo. El conjunto de estos procesos, es lo que determina el comportamiento farmacocinético característico de cada principio activo, y su biodisponibilidad.

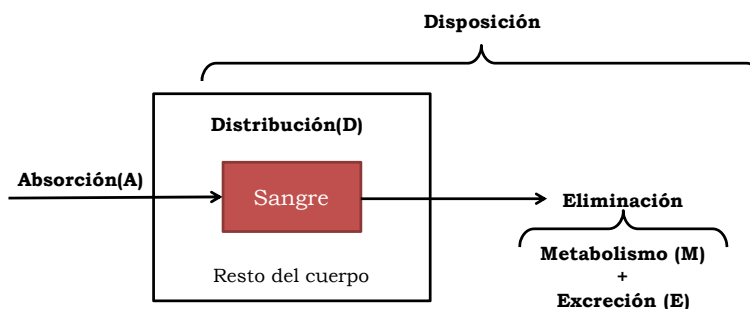


Figura 1.1. Esquema de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción en el organismo. Modificación de Rowland y Tozer, 2011.

1.1. Liberación

Es el primer proceso que sufre el principio activo tras su administración oral, finalizándose con la disolución del mismo, excepto en el caso de la administración de una solución, en la cual éste ya se encuentra disuelto. Todos los compuestos, en general, deben hallarse disueltos para que poder absorberse (**figura 1.2**).

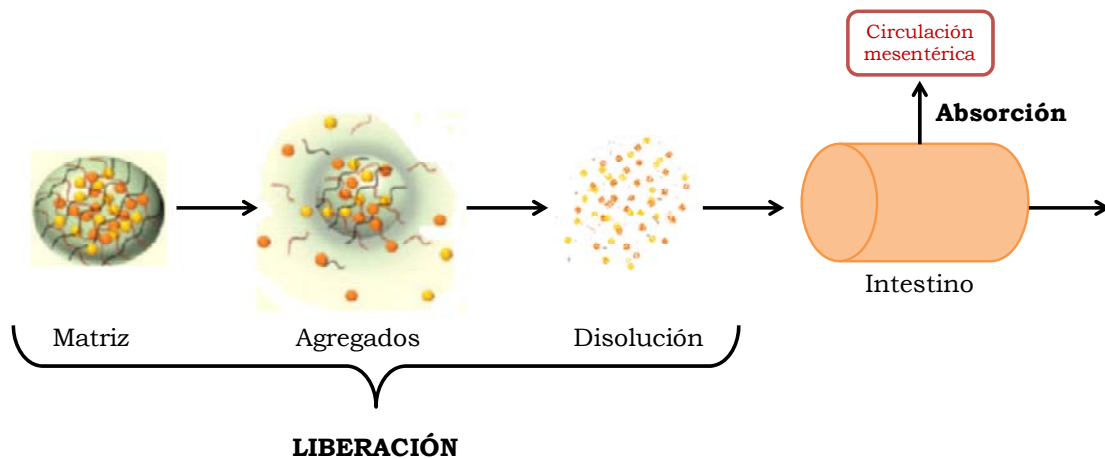


Figura 1.2. Proceso de liberación

En el caso de compuestos bioactivos procedentes de la dieta, como los polifenoles, lo natural es que se encuentren dentro de las matrices alimentarias: zumos y/o batidos de frutas y/o hortalizas, o bien en productos cocinados, libres o unidos a macromoléculas o micronutrientes, desde donde han de liberarse para proceder a su absorción. Numerosas investigaciones informan acerca de la influencia de la matriz alimentaria y/o del procesado en los niveles plasmáticos de diferentes polifenoles. Algunos ejemplos se exponen en la **tabla 1.1**. En ellos puede observarse, por ejemplo, cómo la presencia de aceite de oliva refinado produce un aumento en los niveles plasmáticos de la naringenina presente en salsa de tomate, así como también el procesado (acciones térmicas y mecánicas) (Martínez-Huélamo *et al.* 2015; Tulipani *et al.* 2012).

Tabla 1.1. Influencia de la matriz y del procesado en los niveles plasmáticos de algunos polifenoles.

Referencia	Sujetos	Polifenol y Dosis oral	Parámetros	Conclusión
Bugianesi <i>et al.</i> 2002	5 humanos sanos	Dosis: 70 g pasta de tomate (3.8 mg de naringenina)	Plasma $C_{max} = 0.07 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ (2h)	Primer estudio en el que se determina naringenina en plasma en humanos tras el consumo de salsa de tomate. Comparado con Bugianesi <i>et al.</i> 2004, la salsa de tomate mejora los niveles plasmáticos respecto al tomate puramente cocinado.
Adam <i>et al.</i> 2002	Ratas Wistar	Dieta suplementada con 10 $\mu\text{mol/día}$ ácido ferúlico Dieta suplementada con 50 $\mu\text{mol/día}$ ácido ferúlico Dieta suplementada con 250 $\mu\text{mol/día}$ ácido ferúlico Dieta a base de cereales (~ 50 $\mu\text{mol/día}$ ácido ferúlico)	$C_{plasma} = \text{n/d}$ $C_{plasma} = 1.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ $C_{plasma} = 7.6 \pm 1.9 \mu\text{mol/L}$ $C_{plasma} = \text{n/d}$	Los niveles plasmáticos del ácido ferúlico son menores cuando se absorbe como parte de los cereales, respecto a su ingesta libre en las dietas suplementadas, debido a la unión con las fibras que constituyen la matriz de los cereales.
Bugianesi <i>et al.</i> 2004	5 humanos sanos	Dosis : 500 g tomate cherry fresco (19.5 \pm 7.3 mg de naringenina) Dosis : 500 g tomate cherry cocinado (17.0 \pm 3.8 mg de naringenina)	Plasma $C_{max} = \text{n/d}$ Plasma $C_{max} = 0.06 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ (2 h)	El procesado del tomate parece incrementar la biodisponibilidad de la naringenina, debido a provocar la liberación de la naringenina unida a la fibra de la fruta (matriz alimentaria).
Silberberg <i>et al.</i> 2005	Ratas Wistar	Dieta Quercetina (45-47 mg / día) Dieta Catequina (45-47 mg / día) Dieta Quercetina + Catequina (45-47 mg / día)	$C_{plasma Q} = 32\%$ mayor que en coadm. $C_{plasma C} = 28\%$ mayor que en coadm. $C_{plasma C-Q} 28-32\%$ menor	Un aumento en el contenido de polifenoles disminuye la biodisponibilidad de los mismos.
Tulipani <i>et al.</i> 2012	5 humanos sanos	Dosis : 100 g salsa de tomate sin aceite Dosis : 100 g salsa de tomate con aceite de oliva Dosis : 100 g salsa de tomate con aceite oliva refinado	Plasma $C_{max \text{ NAR-GLU}} = 446 \pm 48.8 \text{ nmol/L}$ Plasma $C_{max \text{ NAR-GLU}} = 398 \pm 86.8 \text{ nmol/L}$ Plasma $C_{max \text{ NAR-GLU}} = 299 \pm 30.1 \text{ nmol/L}$	El calor y los procesos mecánicos producen una mayor cantidad de compuestos fenólicos en la salsa de tomate que se traduce en un aumento de sus niveles plasmáticos. El tipo y el contenido de aceite utilizado determinan la farmacocinética la aglicona como de sus metabolitos.
Martínez-Huélamo <i>et al.</i> 2015	8 humanos sanos	Dosis : 7 g tomate fresco/ kg peso sujeto Dosis : 3.5 g salsa de tomate sin aceite/ kg peso sujeto Dosis : 3.5 g salsa de tomate con aceite refinado/ kg peso sujeto	Plasma $C_{max} = \text{n/d}$ Plasma $C_{max} = 11.9 \pm 2.7 \text{ nmol/L}$ Plasma $C_{max} = 12.8 \pm 3.1 \text{ nmol/L}$	Se observa un incremento de los niveles plasmáticos de la naringenina cuando se administra tomate en forma de salsa respecto a fresca. Añadir aceite en la salsa de tomate aumenta sus niveles plasmáticos, pero en menor medida que el propio efecto del procesado.
Arranz <i>et al.</i> 2015	11 humanos sanos	Dosis : 750 g zumo de tomate/70 kg/ día (47 mg <i>trans</i> -licopeno) Dosis : 750 g zumo de tomate con aceite/70 kg/ día (47 mg <i>trans</i> -licopeno)	Plasma $C_{max} = 0.98 \pm 0.29 \text{ mg/L}$ Plasma $C_{max} = 1.78 \pm 0.64 \text{ mg/L}$	La adición de aceite de oliva al zumo de tomate produce un aumento en los niveles plasmáticos de los carotenos del tomate.

n/d= no detectado

1.2. Absorción

Centrándonos en la vía oral, la absorción es el proceso mediante el cual el fármaco o el compuesto bioactivo atraviesa la membrana intestinal para alcanzar la circulación mesentérica. Es un proceso requerido para que un compuesto sea biodisponible. Los principales factores que afectan a la absorción de los principios activos se exponen en la **tabla 1.2**:

Tabla 1.2. Factores que influyen en la absorción gastrointestinal de principios activos

Características fisicoquímicas del principio activo	Factores fisiológicos del tracto gastrointestinal	Factores que dependen de la matriz y del procesado
Solubilidad	Vaciado gástrico	Liberación y velocidad de disolución
Log <i>P</i>	Motilidad intestinal	
p <i>Ka</i>	Superficie de absorción	
Formación puentes de hidrógeno	Metabolismo intestinal	
Peso/tamaño molecular	Mecanismos de transporte	
Superficie polar	Tensioactivos naturales	
	Secreciones intestinales	
	Flujo sanguíneo/linfático	

P = coeficiente de reparto octanol/agua. (Modificado de Griffin y O'Driscoll , 2008)

A continuación se desarrollan con más profundidad algunos de estos aspectos.

1.2.1. Factores fisiológicos

La absorción de macro y micronutrientes, al igual que compuestos bioactivos provenientes de los alimentos, de xenobióticos y fármacos administrados por vía oral ocurre a lo largo del tracto gastrointestinal. Morfológicamente el tracto gastrointestinal se compone de varios tramos bien diferenciados: esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso. Aunque la absorción puede producirse en todos los tramos (excepto en el esófago), el intestino delgado es el que está más especializado en esta función. También puede existir absorción en la mucosa sublingual.

Anatomía del tracto gastrointestinal:

Estómago

El estómago es una dilatación característica del tubo digestivo en forma de J, ubicada entre el esófago y el duodeno (primera parte del intestino delgado). La principal función fisiológica del estómago es la digestión de los alimentos, pero también es capaz de absorber otros compuestos. La pared gástrica se compone de 4 capas básicas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La superficie de la mucosa es una capa de células epiteliales cilíndricas sencillas, llamadas “células de la superficie de la mucosa”, seguidamente se encuentra una capa de tejido conectivo areolar o lámina propia y por último una capa de músculo liso. Las células epiteliales llegan hasta la lámina propia, donde forman columnas de células secretoras, que revisten las criptas o fosas gástricas (**figura 1.3**) (Tortora GJ, Grabowski SR , 2004).

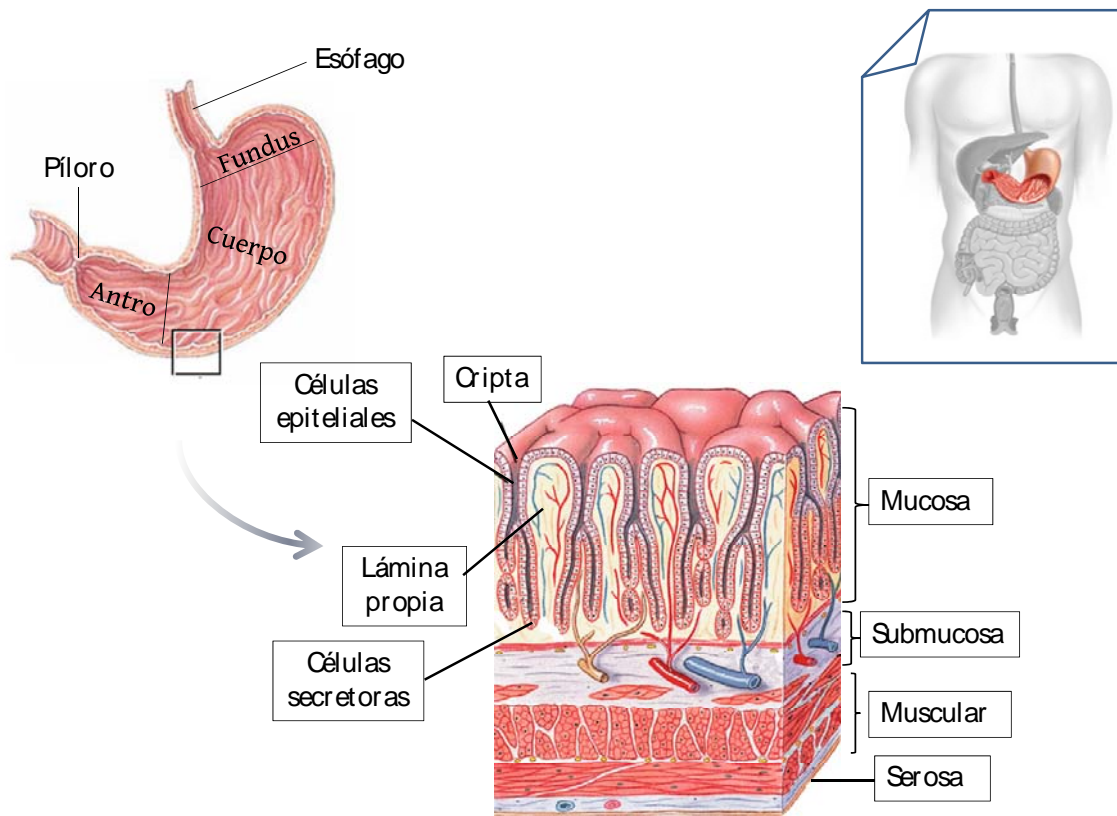


Figura 1.3. Anatomía e histología del estómago

Intestino delgado

El intestino delgado comienza en el esfínter pilórico gástrico, describe curvas en las porciones central e inferior del abdomen y termina cuando empieza el intestino grueso. Se divide en 3 partes: el duodeno, se trata de la porción más corta, de unos 25 cm de longitud que va desde el esfínter pilórico; el yeyuno que comienza allí donde termina el duodeno y tiene casi 1 m de

longitud y el íleon, que es la parte más larga del intestino delgado con unos 2 m de longitud. Su principal función es la de digestión y absorción de nutrientes y xenobióticos.

Al igual que el estómago, la pared intestinal se compone de 4 capas básicas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La capa epitelial de la mucosa se dispone en forma de pliegues de unos 10 mm de altura con lo cual aumenta la absorción al aumentar el área de la superficie intestinal. La mucosa además forma un gran número de vellosidades digitaliformes de 0.5-1 mm de altura, incrementando considerablemente el área de superficie epitelial disponible para la absorción. Cada vellosidad posee un centro de lámina propia, que incluye arteriola, vénula, red de capilares sanguíneos y vaso quilífero (capilar linfático). El epitelio de la mucosa incluye células de absorción, en cuya membrana apical se forman microvellosidades, que forman el llamado “borde de cepillo” que se extiende en la luz del intestino delgado. Estas estructuras también incrementan considerablemente el área superficial de absorción constituyendo una superficie de 200 m² (**figura 1.4**) (Tortora GJ, Grabowski SR, 2004).

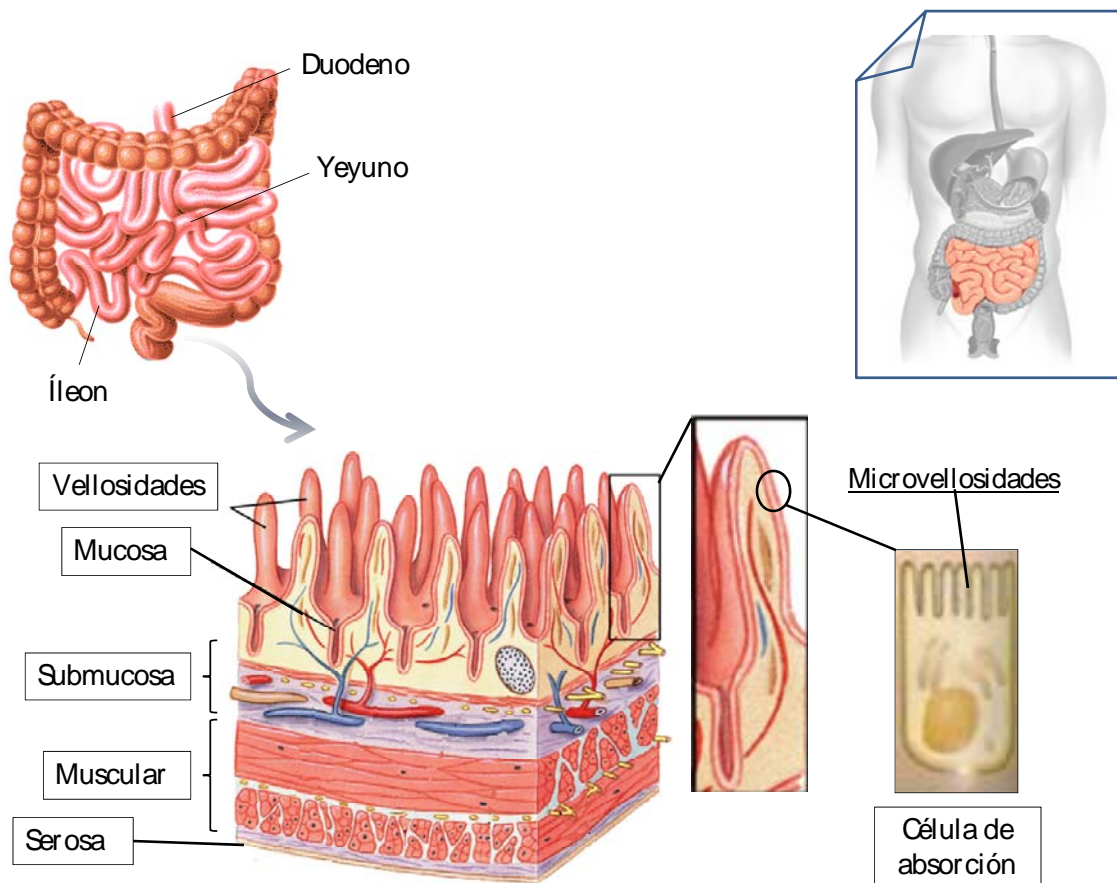


Figura 1.4. Anatomía e histología del intestino delgado.

Intestino grueso

El intestino grueso es la porción terminal del tubo digestivo y se divide en 4 partes: ciego, colon, recto y conducto anal. En general, sus funciones son las de completar la absorción, producir ciertas vitaminas, formar las heces y expulsarlas del organismo. Tiene una longitud de 1.5 m y se extiende del íleon al ano. La pared del intestino grueso se compone de las mismas 4 capas que las partes anteriores, pero histológicamente presenta diferencias. En primer lugar, la mucosa, está desprovista de vellosidades y pliegues circulares, con lo cual tiene una superficie de absorción mucho menor a las anteriores (1.5 m²). El epitelio contiene células de absorción y caliciformes (segregan moco). Por otro lado, la capa muscular tiene ciertas partes de las capas de músculo liso están engrosadas y forman las tenias del colon (**figura 1.5**) (Tortora GJ, Grabowski SR, 2004).

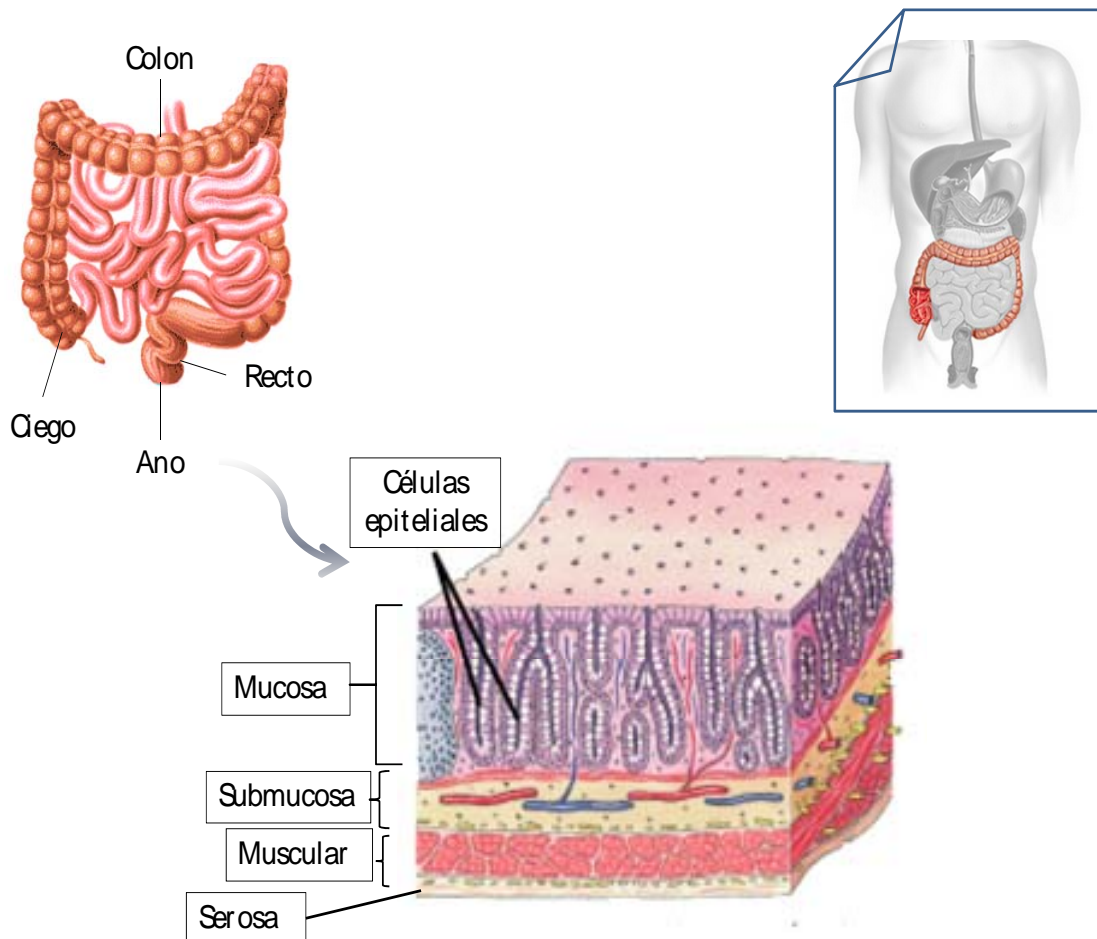


Figura 1.5. Anatomía e histología del intestino grueso

Mecanismos de absorción

Los principales mecanismos de absorción son los siguientes:

1. Absorción paracelular: Algunos compuestos con pesos moleculares bajos (< 300 g/mol) e hidrofilia elevada, son capaces de atravesar los espacios intercelulares, utilizándolos como camino para llegar a la sangre. Es una ruta minoritaria.
2. Transporte transcelular: Es el paso de sustancias a través de las células intestinales. En la **figura 1.6** se exponen los diferentes tipos de transporte transcelular.

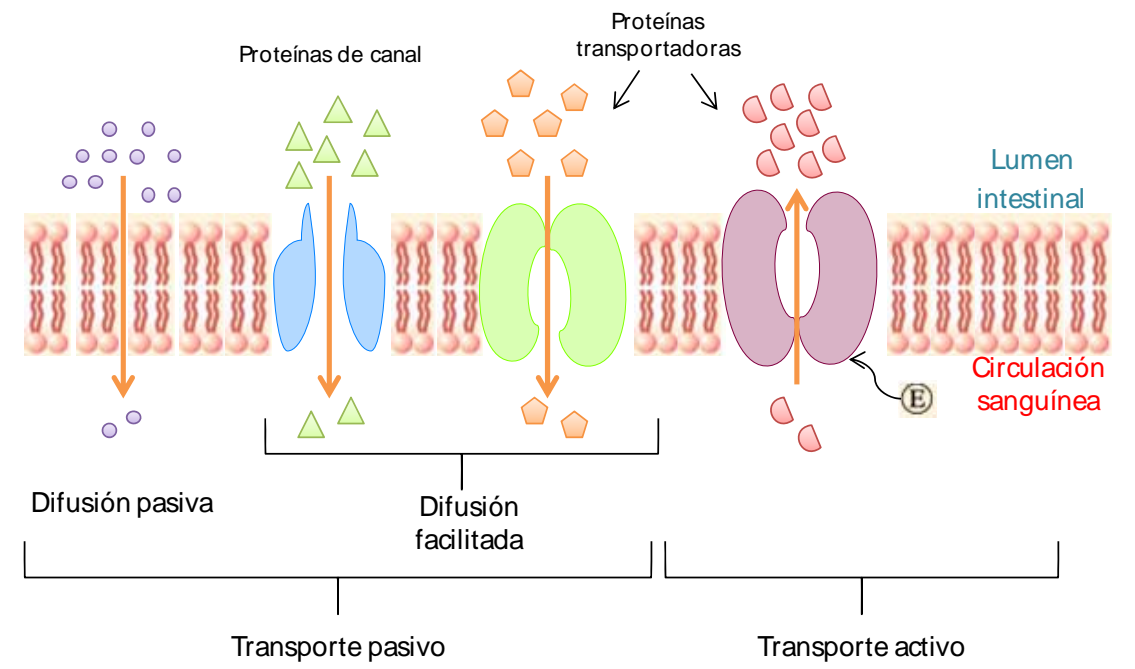


Figura 1.6. Tipos de transporte transcelular.

- a) **Difusión pasiva**: Es el mecanismo más importante en la absorción de xenobióticos; se trata de un proceso pasivo que no consume energía y se da a favor del gradiente de concentración. Se puede dar a través de la membrana lipídica o a través de poros acuosos. A través de la membrana lipídica se absorben rápidamente las moléculas lipófilas, ya que son capaces de disolverse en las regiones no polares de la bicapa lipídica.

Los poros acuosos se caracterizan por presentar cargas y por poseer un diámetro reducido, lo cual hace que representen un camino restringido a la absorción de moléculas o iones de peso molecular inferior a 200-250 Daltons.

En ambos casos el proceso de absorción sigue una cinética de primer orden.

- b) **Transporte mediado por transportadores**: Este tipo de transporte está mediado por proteínas integradas de membrana (proteínas transportadoras). Es un mecanismo de

.. *Introducción*

transporte **selectivo** (sólo se unen moléculas con una estructura determinada) y **saturable**. Es especialmente importante en el yeyuno (Jhonson *et al.* 2006); pueden darse fenómenos de inducción e inhibición proteica, y de competitividad por el mismo transportador. Es el mecanismo utilizado por algunos compuestos polares y/o cargados de elevado peso molecular que requieren de una proteína de membrana para el transporte transmembrana.

Tipos:

→ **Difusión facilitada**: Se hace a favor de gradiente y no hay consumo de energía.

→ **Transporte activo**: Se realiza en contra de gradiente de concentración, con lo que requiere un gasto de energía. La energía puede venir directamente de la hidrólisis del trifosfato de adenosina o ATP (*adenosine triphosphate*) (transportadores primarios) o puede suministrarse en forma de movimiento de otro soluto a favor de su gradiente electroquímico con suficiente energía como para transportar otro soluto contra gradiente (transportadores secundarios).

El transporte activo se puede clasificar según el sentido del transporte:

- a) **Transporte activo de absorción o influx**: Las proteínas que intervienen transportan el fármaco o compuesto bioactivo al interior de la célula, es decir, a través de la membrana en sentido lumen-sangre. Las proteínas de las familias OATPs (*organic anions transporting polypeptides*).
- b) **Transporte de secreción o efflux**: Las proteínas que intervienen extraen el compuesto fuera de la célula, devolviendo al lumen intestinal las moléculas de fármaco que atraviesan la membrana del enterocito. Como resultado, la absorción es menor de la esperada. La principal proteína de membrana implicada en este tipo de transporte es la P-glicoproteína (P-gp, *P-glycoprotein*).

El **HUGO Human Gene Nomenclature Committee**, es el organismo que se encarga de asignar un nombre oficial a las proteínas encargadas del transporte activo de diferentes moléculas (azúcares, vitaminas, aminoácidos y ácidos biliares) y xenobióticos (fármacos y/o compuestos bioactivos). Este las clasifica en dos clases principales: SLC (*Solute Carrier*) y ABC (*ATP-binding cassette*) (Yang *et al.* 2014).

- a) SLC: Es un grupo de proteínas transmembrana que engloban 396 miembros organizados en 52 familias, que se encargan en su mayoría de la absorción de sustancias. Dentro de esta superfamilia, los OATPs, también llamados SLC21A, han sido relacionados recientemente con el transporte de flavonoides y flavonoides

conjugados como la quercetina y sus glucosidos. Además se ha visto que flavonoides como la naringenina pueden interactuar inhibiendo su efecto, es decir disminuyendo el transporte de otros flavonoides como la quercetina (Jiang y Hu, 2012).

- b) ABC: Es una de las superfamilias de proteínas más amplia y antigua. Estas utilizan ATP como forma de energía para ejercer su función. Son capaces de transportar sustancias dentro y fuera de las membranas, incluyendo metabolitos, lípidos y esteroides y fármacos. La superfamilia comprende 7 familias con 51 miembros. Ejemplos de estas familias son: MDR (*Multi Drug Resistance*), MRPs (*Multidrug Resistance associated Proteins*) y BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*). Estas proteínas están relacionadas con la resistencia del tumor o la fibrosis quística. Dentro de esta superfamilia caben destacar la P-gp, el MDR1 y el MPR2, por su implicación en la absorción de varios flavonoides como la naringenina y la quercetina (Chabane *et al.* 2009). Además se ha visto como los flavonoides pueden actuar inhibiendo o induciendo su efecto (Jiang y Hu, 2012).

3. Transporte vesicular: Es un proceso que permite el paso de grandes moléculas a través de la membrana (fagocitosis), o bien de material líquido (pinocitosis). Durante este proceso la membrana forma una vesícula hacia el interior, englobando el principio activo.

La absorción de los distintos principios activos puede implicar uno o varios de los tipos de transporte anteriormente mencionados. En principio, interesaría una elevada absorción de los compuestos bioactivos del tomate, excepto en el caso de aquellos compuestos que tienen efecto anticancerígeno a nivel intestinal, por ejemplo, la epigalocatequina o el ácido elágeno, ambos polifenoles del té, son capaces de ejercer acción anticancerígena en el tracto aerodigestivo (Lambert, 2003).

La *motilidad intestinal* y las *secreciones intestinales* también se consideran aspectos fisiológicos importantes en la absorción de principios activos. La motilidad intestinal facilita el contacto de los compuestos con la superficie intestinal y condiciona el tiempo de residencia del compuesto en la zona de absorción. Las secreciones intestinales por su parte, determinan el pH de la zona, importante en la ionización de los compuestos que juega un papel fundamental en la absorción de los mismos, así como hay compuestos segregados que funcionan como *tensoactivos naturales* (sales biliares y lecitinas) que favorecen la disolución de los compuestos poco solubles.

1.2.2. Factores que dependen del principio activo

Las características físicoquímicas influyen directamente en el mecanismo de transporte que utilice un principio activo para atravesar la membrana. Cuando un principio activo utiliza la

.. Introducción

difusión pasiva para su absorción los factores que mayor influencia tienen en la misma son el peso y/o tamaño molecular, el grado de ionización y la lipofilia del compuesto.

La velocidad de absorción a través de la membrana puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{P \cdot D}{e} \cdot S \cdot (C_1 - C_2) \quad \text{(Ecuación 1),}$$

donde: dM/dt es la cantidad de sustancia por unidad de tiempo que difunde a través de la membrana (*velocidad de difusión*), P es el coeficiente de reparto de la sustancia entre la membrana y el medio acuoso, D es el coeficiente de difusión de la molécula en la membrana, e es el espesor de la membrana o espacio recorrido, S es la superficie de la membrana y $(C_1 - C_2)$ es el gradiente de concentración. Dado que en el organismo se cumplen las llamadas **condiciones sink o sumidero** ($C_1 \gg C_2$), ésta ecuación puede aproximarse a:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{P \cdot D}{e} \cdot S \cdot C_1 \quad \text{(Ecuación 2),}$$

donde C_1 sería la concentración en el lumen intestinal.

Si dividimos a ambos miembros de la ecuación por V (volumen acuoso donde se encuentra el fármaco) la ecuación se transforma en niveles de concentración:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{P \cdot D}{e \cdot V} \cdot S \cdot C_1 \quad \text{(Ecuación 3),}$$

donde dC/dt es la velocidad de absorción expresada en concentración/tiempo. Considerando un determinado principio activo con unas características fisicoquímicas concretas, en una especie animal concreta y tras la administración oral, P , D , e , V y S permanecen constantes, con lo que la ecuación se reduce a:

$$\frac{dC}{dt} = k_a \cdot C \quad \text{(Ecuación 4),}$$

donde k_a sería la constante de velocidad de absorción de acuerdo con una *cinética de primer orden* característica del proceso de absorción por **difusión pasiva**.

De acuerdo con la **ecuación 1** los factores de mayor influencia en la absorción por difusión pasiva son el grado de ionización y la lipofilia del compuesto.

.....*Introducción.*.....

En general, las formas no ionizadas son más liposolubles y por tanto más permeables. Los compuestos ácidos se absorberán mejor a nivel del estómago (pH ácido=1-2) y los básicos a nivel del intestino delgado o grueso (pHs básicos= 6.2 y 7.4 respectivamente).

Es decir, los procesos de absorción pasiva a través de la membrana biológica se rigen por dos bases:

- ✓ Mayoritariamente se absorben las formas no ionizadas.
- ✓ La velocidad de absorción es proporcional a su coeficiente de reparto P (lipofilia).

La **fracción no ionizada** o f se calcula con la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{Para compuestos ácidos: } f = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pKa)}} \quad \text{(Ecuación 5),}$$

$$\text{para compuestos básicos: } f = \frac{1}{1 + 10^{(pKa - pH)}} \quad \text{(Ecuación 6).}$$

La ionización no es el único factor responsable de la absorción de los principios activos. Hay compuestos que poseen el mismo grado de ionización (pka parecido) y la misma estructura base y que sin embargo, se absorben de manera diferente. Esto se debe a que difieren en su **coeficiente de reparto** o la lipofilia. Aquellos que tienen una fracción no ionizada más lipófila se absorben mejor que los otros.

La lipofilia o hidrofobicidad de los compuestos está determinada por el coeficiente de reparto (octanol-agua) o log P . El log P es el parámetro que mejor representa el comportamiento de un compuesto con respecto a la membrana. Se define por el logaritmo del cociente entre la concentración de soluto en octanol y la concentración del soluto en agua, a una temperatura definida (**Ecuación 7**)

$$\log P = \log \left(\frac{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluto}]_{\text{agua}}} \right) \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Respecto a los polifenoles y en particular a los flavonoides, la hidrofobicidad varía mucho según a la familia a la que pertenezcan y dentro de ella, según sean las propiedades de sus sustituyentes. La **tabla 1.3** resume los log P de varios flavonoides extraídos de distintas fuentes bibliográficas.

Tabla 1.3. Valores de log P de algunos flavonoides.

Flavonoide	Grupo	log P ± SD (n=5)
Luteolina	Flavona	3.22 ± 0.08 ^a
Kampferol	Flavonol	3.11 ± 0.54 ^a
Genisteina	Isoflavona	3.04 ± 0.02 ^a
Apigenina	Flavonona	2.92 ± 0.06 ^a
Naringenina	Flavonona	2.60 ± 0.03 ^a
		2.52 ^b
		2.47 ^c
Daidzeina	Isoflavona	2.51 ± 0.06 ^a
Eriodictiol	Flavanona	2.27 ± 0.02 ^a
Glyciteina	Isoflavona	1.97 ± 0.05 ^a
Quercetina	Flavonol	1.82 ± 0.32 ^a
		1.48 ^b
		1.81 ^c
Rutina	Flavonol (glucosido)	- 0.64 ± 0.05 ^a


 Liposolubilidad
 

a) Rothwell *et al.* 2005; b) Chabane *et al.* 2009; c) Drug Bank

1.3. Distribución

La distribución es el proceso de transferencia reversible de un principio activo desde la sangre a los distintos espacios extravasculares del organismo (órganos, tejidos y fluidos). En la distribución se ven implicados diferentes mecanismos de transporte o transferencia de materia como son:

- Convección: transporte del principio activo por el torrente sanguíneo.
- Dispersión en los diferentes espacios acuosos corporales.
- Paso a través de las membranas (vasculares o celulares).
- Unión a estructuras plasmáticas y tisulares.

El proceso de distribución depende básicamente de la perfusión sanguínea, de la capacidad del compuesto de atravesar las membranas plasmáticas y celulares (características físico-químicas) y de su afinidad por las proteínas plasmáticas y tisulares ya que, para distribuirse el principio activo debe encontrarse libre en el torrente sanguíneo; sólo la fracción libre será capaz de atravesar las membranas y llegar a los tejidos.

En lo que respecta a los polifenoles, debido a la diversidad química de los mismos, no se puede determinar un comportamiento común para todos. Sin embargo, individualmente si se ha visto cómo la distribución de cada uno varía según sus características-físicoquímicas y como el posible efecto bioactivo que producen los polifenoles está relacionado con el lugar hacia dónde se distribuyen. En este sentido, Liang *et al.* 2013 llevó a cabo un estudio en ratas en donde tras

la administración de resveratrol por vía gástrica se observó como los tejidos donde más se distribuía el flavonoide eran el pulmón y el corazón, órganos donde el resveratrol ejercía su efecto cardio-protector (Petrovski *et al.* 2011) y la mejora de la función respiratoria (Wood *et al.* 2010). Por otra parte, Mohsen *et al.* 2004 estudió la distribución de la naringenina tras su administración por vía gástrica y mediante un método radioactivo cuantificó la naringenina en órganos a las 2 y las 18 h. El corazón y el cerebro fueron los lugares donde se observó mayor concentración de naringenina, coincidiendo con el efecto cardioprotector descrito para la naringenina. También se ha visto como la distribución de los flavonoides puede verse afectada por la unión a proteínas plasmáticas: compuestos como la naringenina y la quercetina tienen cierta afinidad por la albúmina, lo que supondría una disminución en el volumen de distribución en el organismo. Shi y Cao, 2011, observaron como la quercetina tenía una mayor afinidad por la albúmina que la naringenina.

1.4. Metabolismo

La eliminación de xenobióticos del organismo se produce por excreción y metabolismo. Algunos compuestos pueden excretarse directamente, pero la mayor parte sufren un proceso de biotransformación metabólica. La conversión bioquímica (enzimática) de un fármaco o principio bioactivo en otra forma química (metabolito) con el fin de eliminarlo del organismo, se le denomina metabolismo. Como definición, el metabolismo consta del anabolismo y del catabolismo, es decir, de la constitución y de la descomposición de las sustancias por conversión enzimática de una entidad química en otra en el interior del organismo (Rang *et al.* 2012). La principal vía de eliminación de xenobióticos son los riñones; sin embargo, deben ser previamente metabolizadas a sustancias más polares, capaces de ser excretados por la orina. Los flavonoides son estructuras de diferente naturaleza, lipófilas e hidrófilas. La naringenina, es un compuesto lipófilo y por lo tanto requiere del metabolismo para ser eliminada por el organismo. El hígado es el principal órgano metabolizador, pero también se dan reacciones de biotransformación metabólica en otros órganos y tejidos. Las células del tracto gastrointestinal son capaces de metabolizar xenobióticos mediante reacciones de fase I y de fase II (Lin *et al.* 1999). Asimismo y sobre todo a nivel del colon, los compuestos polifenólicos pueden sufrir cambios debido a la acción de la microbiota.

En general el proceso de biotransformación se lleva a cabo mediante reacciones de fase I y fase II. Con el objetivo de aumentar la hidrosolubilidad del compuesto para ser excretado a través de la orina.

- a) Metabolismo de fase I: Son reacciones catabólicas: oxidación, reducción e hidrólisis. Se añaden sustituyentes a la molécula (ej., grupo hidroxilo) que aumentan su polaridad e

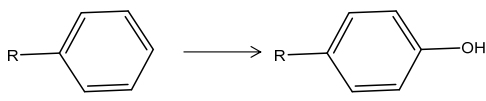
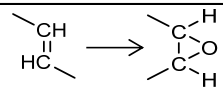
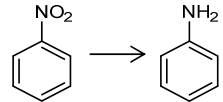
.. Introducción

hidrofilia. El producto resultante puede ser atacado o no, por los enzimas de la fase II. La **tabla 1.4** describe las principales reacciones metabólicas de fase I.

- b) Metabolismo en fase II: Son reacciones anabólicas e implican la conjugación de una molécula endógena al compuesto. Ejemplos de sustancias endógenas son: el ácido acético, el ácido glucurónico o el ácido sulfúrico, que aumentan el tamaño de la molécula y su hidrosolubilidad, facilitándose, en consecuencia, su excreción por bilis y/o orina.

Los polifenoles sufren reacciones de fase I y/o de fase II o ambas secuencialmente.

Tabla 1.4. Principales reacciones metabólicas de fase I

Reacciones de fase I	Tipos	Reacción química
Oxidación	Hidroxilación alifática	$R_1 - CH_2 - R_2 \rightarrow R_1 - CHOH - R_2$
	Hidroxilación aromática	
	Desalquilación	$R - NH - CH_3 \rightarrow R - NH_2 + HCHO$
	Desaminación oxidativa	$R_1 - \underset{\substack{ \\ R_2}}{CH} - NH_2 \rightarrow R_1 - \underset{\substack{ \\ R_2}}{CO} + NH_3$
	N-oxidación/ N-Hidroxilación	$R_1 \equiv N \rightarrow R_1 = N - O$
	Sulfoxidación	$R_1 - \underset{\substack{ \\ R_2}}{S} \rightarrow R_1 - \underset{\substack{ \\ R_2}}{SO_2}$
	Desulfuración	$R_1 - \underset{\substack{ \\ R_2}}{S} \rightarrow R_1 - \underset{\substack{ \\ R_2}}{O}$
	Epoxidación	
	Deshalogenación	$R_1 - CHCl - R_2 \rightarrow R_1 - CHOH - R_2$
	Oxidación de alcoholes y aldehidos	$R - CH_2OH \rightarrow R - COOH$
Reducción	Nitro/ Azoreducción	 $R_1 - N = N - R_2 \rightarrow R_1 - NH_2 + R_2 - NH_2$
	Deshalogenación reductora	$R - CCl_3 \rightarrow R - CHCl_2$
Hidólisis	De esterés y aminas	$R_1 - CO - O - R_2 \rightarrow R_1 - COOH + R_2 - OH$

*Rang *et al.* 2012 modificado.

Metabolismo en fase I

Citocromo P450

El sistema enzimático más utilizado en el metabolismo de los xenobióticos está constituido por enzimas oxidativas del retículo endoplasmático liso; estos enzimas se denominan oxidasas de función mixta u monooxidasas. La oxidasa termina en una hemoproteína especial denominada

citocromo P450 o CYP450 (*cytochrome P450*). El metabolismo en fase I se produce mayoritariamente por el CYP450, responsable de los productos de oxidación y reducción.

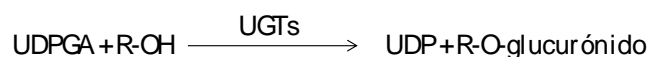
El CYP450 se encuentra en el retículo endoplasmático de todas las células del organismo pero especialmente en el hígado y en la pared intestinal. El sistema del CYP450 configura una superfamilia de enzimas relacionadas pero diferentes. En la especie humana se han caracterizado entre 25 y 30 CYP450. Se nombran con el prefijo CYP, seguido del número que designa la familia, una letra que indica la isoforma, y un número que marca la forma individual del gen productor. Las tres principales familias involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en humanos son CYP1, CYP2 y CYP3. El 50% del metabolismo de los xenobióticos se produce con la participación de la subfamilia CYP3A; representa el 30% de los citocromos del hígado y el 70% de los citocromos en los enterocitos. En el metabolismo de los flavonoides las subfamilias CYP3A4 y 3A5 juegan un papel importante. El CYP3A4 es el más abundante (60%) y se encuentra en hígado y a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, siendo menor su expresión en estómago y colon. Estas enzimas son probablemente las responsables del metabolismo oxidativo de la naringenina (Egert *et al.* 2011; Canaparo *et al.* 2007; Thrön 2005). Los citocromos pueden ser inducidos o inhibidos por otras moléculas, produciendo un aumento o disminución de su acción metabólica, como en el caso de la naringenina y la quercetina que han resultado ser inhibidores del CYP3A (Choi *et al.* 2004).

Metabolismo en fase II

Como se ha explicado anteriormente el metabolismo en fase II implica la formación de metabolitos conjugados gracias a la acción de los enzimas que se encuentran tanto en hepatocitos como en enterocitos. Para que un compuesto o metabolito sufra este tipo de metabolismo ha de poseer un grupo “asidero apropiado” (ej., hidroxilo, tiol o amino) que le permita fijar un grupo sustituto (ej., glucurónido, sulfato, metilo o glutatión (GSH, *glutathione*) en su estructura. Los enzimas mayoritarios que se encargan de esta conjugación son las UDP-glucotransferasas (UGTs, *UDP-glucuronosyltransferase*), las sulfotransferasas (SULFs, *sulfotransferases*), las catecol-*O*-metil-transferasas (COMT, *catechol-O-methyltransferase*) y las glutatión-*S*-transferasas (GSTs, *glutathione-S-transferases*). Estudios recientes han puesto de manifiesto que el metabolismo de conjugación a nivel intestinal juega un papel importante en el metabolismo de los flavonoides antes de pasar a sangre o a hígado. Por ello, es de gran importancia el estudio del efecto de primer paso intestinal como factor causante de baja biodisponibilidad que presentan muchos flavonoides tras su ingesta; gran parte de la pérdida de la forma aglicona se produce a este nivel.

Glucuroconjugación

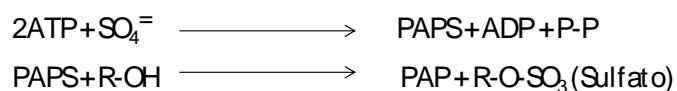
La glucuroconjugación es la reacción de conjugación más frecuente. Se produce cuando el uridina difosfo-glucurónico o UDPGA se combina con un compuesto o metabolito y cede el ácido glucurónico a un átomo rico en electrones (N, O o S), como grupos fenol, ácidos carboxílicos o anillos aromáticos, gracias a la acción de la UGT.



Éste enzima se encuentra tanto en el hígado, como en el tubo digestivo, riñón y piel. En el tracto gastrointestinal las UGTs se encuentran en las células de la mucosa (Peters y Jansen, 1988). En el estómago, se encuentran en la superficie de la mucosa y en el colon se detecta en la capa epitelial, pero no en la lámina propia o en la submucosa (Strassburg *et al.* 1999). Muchos autores han demostrado la participación de este enzima en el metabolismo de los flavonoides. En particular, en el metabolismo de la naringenina, forma naringenin-4-*O*- β -glucurónico y naringenin-7-*O*- β -glucurónico (Cermak, 2008; Orrego-Lagarón *et al.* 2015; Xu *et al.* 2010), en función de si la sustitución se realiza en la posición 4 del anillo B o 7 del anillo A (figura 1.17).

Sulfoconjugación

La sulfoconjugación es también una reacción bastante frecuente. Se produce gracias a enzimas SULFs. Requiere la activación previa del SO_4^{2-} mediante el ATP, formándose 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato o PAPS. Los fenoles, alcoholes y aminas son propensos a sufrir esta conjugación.



Dichas enzimas se encuentran mayoritariamente en el hígado e intestino, y en menor medida en plaquetas, placenta, útero o cerebro. A lo largo del tracto gastrointestinal se observan en mayor medida en intestino delgado, seguido de estómago y colon (Chen *et al.* 2003). Su participación en el metabolismo de los flavonoides está más que confirmada, dando para la naringenina la formación de naringenin-7-*O*-sulfato y naringenin-4-*O*-sulfato.

Metilación

Existen diferentes grupos de enzimas metiltransferasas, pero la principal es la COMT. Ésta interviene en las reacciones en las que el grupo metilo se incorpora a un oxígeno. Interviene en la metilación de las catecolaminas y en el caso de los flavonoides, sólo aquellos que poseen un

grupo catecol en su estructura como la quercetina podrán ser conjugados por ella. Sin embargo, la naringenina no se ve afectada por su acción (Felgines *et al.* 2013; Scalbert *et al.* 2002).

Conjugación con glutatión

El tripéptido glutatión o GSH (glutamil-cisteinil-glicina) intracelular, que está en su mayor parte en su forma tiol, es un fuerte nucleófilo capaz de inactivar fármacos electrófilos mediante reacciones catalizadas por las GSTs. Su papel en el metabolismo de los flavonoides es a través de la unión por su grupo sulfhidrilo a compuestos electrófilos como, por ejemplo, la forma oxidada de la quercetina (*O*-quinona) (Paulikova y Berczeliová, 2005). Sin embargo, no se ha visto interacción con la naringenina.

Inducción e inhibición enzimática

La exposición de un principio activo a los enzimas que se encargan del metabolismo de otro principio activo, puede provocar el aumento o la disminución de la actividad metabolizante. Los enzimas cuya síntesis es inducible o inhibible pertenecen a las familias del CYP450, las UGTs, GSTs y en menor medida a las SULFs. Un determinado inductor o inhibidor puede afectar a una o a varias formas enzimáticas.

Inducción enzimática: Ocurre cuando algunas sustancias son capaces de acelerar el funcionamiento de los enzimas, por lo que se acelera el metabolismo y la eliminación de los compuestos, provocando un descenso en las concentraciones plasmáticas de los mismos. Las consecuencias de la inducción son variadas en función de si el metabolito que se produce es activo o inactivo, es decir, tenga efecto fisiológico o no. Si el metabolito es activo, éste provoca un aumento de la actividad del mismo, al igual que si es tóxico provocará toxicidad. En cambio, si se trata de un metabolito inactivo, la inducción provoca una disminución de la intensidad y la duración del efecto del compuesto “padre”, es decir de la aglicona, en el caso de los flavonoides.

Inhibición enzimática: Es el mecanismo por el cual algunos compuestos son capaces de disminuir la acción de algunos enzimas. Se diferencian dos clases; inhibición competitiva e inhibición no competitiva. En la inhibición competitiva un compuesto ocupa el centro activo del enzima, invadiendo por tanto, en centro activo del otro compuesto. Clínicamente, se produce un incremento de la semivida del compuesto libre, lo que provoca un aumento de su actividad fisiológica. En la inhibición no competitiva el compuesto inhibidor se une al enzima en un sitio distinto del centro activo.

No solo los fármacos son capaces de producir estos efectos inductores o inhibidores; los polifenoles por ejemplo, también son responsables de provocar cambios en el metabolismo de otros fármacos y/o compuestos bioactivos. En el caso de los flavonoides, se ha visto como

.. *Introducción*

pueden regular la acción de los enzimas UGTs, SULFs y GSTs, provocando interacciones fármaco-flavonoide o flavonoide-flavonoide, de gran importancia clínica. Un ejemplo es, el efecto inductor que tienen la naringenina y la quercetina sobre las UGTs. Sun *et al.*, 1998 demostró como estos flavonoides eran capaces de inducir la glucuronidación de testosterona vía UGT2Bs en células cancerosas de próstata LNCaP. La quercetina por su parte, ha demostrado tener efectos inductores de las UGTs en estudios en células Caco-2 (Bock *et al.* 2000; Cermak, 2008; Galijatovic *et al.* 2000; Petri *et al.* 2003). Sobre las SULFs es comúnmente conocido el efecto inhibitorio de los flavonoides como la quercetina sobre su isoforma SULT1A1 (Egert y Rimbach, 2011; Otake *et al.* 2000), pero también puede ser inducida. Chen *et al.* 2005 observó que la biochanin A (flavonoide) inducía significativamente la expresión de las SULT1A1, SULT2A1 y SULT1E1 en hígado e intestino de ratas Sprague–Dawley.

Metabolismo microbiano

La microbiota intestinal se puede considerar como un órgano más, perfectamente integrado en la fisiología humana (Possemiers *et al.* 2011). El intestino es el hábitat natural de una población numerosa y diversa de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en la superficie de las mucosas o la luz del intestino. El intestino contiene unos 100 billones de bacterias de 500 a 1000 especies distintas. En estómago y duodeno se encuentra el menor número de bacterias ($<10^3$ células bacterianas por g de contenido), haciéndose mayor a lo largo del yeyuno e íleon (10^4 - 10^7 células bacterianas por g de contenido). El colon es donde hay mayor densidad de bacterias, unas 10^{11} células bacterianas por g de contenido, una concentración 10.000 veces mayor a la del estómago o intestino delgado (Guarner y Malagelada, 2003; Wang y Yang, 2013).

Una de las funciones más importantes de la microbiota intestinal es la del metabolismo. La diversidad de genes en la comunidad microbiana proporciona una gran variedad de enzimas y vías bioquímicas distintas a la del hospedador. No solo se encargan de la fermentación de los hidratos de carbono no digeribles, de la producción de vitaminas (K, B₁₂...) y de la síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco y urea, sino que también forman parte importante en el metabolismo de xenobióticos, siendo capaces de la bioactivación o detoxificación de los mismos (Kang *et al.* 2013).

La microbiota normalmente produce reacciones reductivas o hidrolíticas que generan compuestos no polares de menor peso molecular. Por ejemplo, en el caso de los flavonoides se forman metabolitos no específicos como ácidos fenilpropiónicos hidroxilados. Ya en 1956 Booth *et al.*, observó como la degradación de los flavonoides implicaba la rotura del anillo heterocíclico. El metabolismo microbiano es de gran importancia para aquellos productos que sufren circulación entero-hepática, ya que debido a ésta los metabolitos conjugados de

diferentes principios activos vuelven al lumen intestinal, donde la microbiota puede hidrolizarlos (por la acción de sus enzimas bacterianas β -glucuronidasas y sulfatasas), provocando la transformación del metabolito en su forma aglicona anterior. Ésto implica que esta forma aglicona pueda absorberse por segunda vez, llegando a sangre, lo que aumentaría el tiempo que se encuentra el principio activo en el organismo.

1.5. Excreción

La excreción puede definirse como el proceso o conjunto de procesos por medio de los cuales un principio activo y sus metabolitos son expulsados al exterior del organismo. Puede realizarse por diferentes vías: renal, biliar o glandular. La mayoría de los principios activos utilizan el riñón como primera vía de eliminación, aunque muchos otros sólo lo hacen parcialmente, utilizando vías como: biliar, intestinal, salival, sudoral y láctea o mamaria.

Excreción renal

Algunos compuestos son excretados directamente a través de la orina (**excreción urinaria**), aunque lo más frecuente es que sufran un proceso de biotransformación previa. La excreción renal se produce en la nefrona mediante la implicación de 1, 2 ó 3 mecanismos: filtración glomerular, secreción activa y/o reabsorción tubular. La velocidad de filtración glomerular es de 120 mL/min para un individuo sano de 70 kg de peso, y solo es filtrada la fracción libre del compuesto, es decir, la no unida a las proteínas plasmáticas. Los otros dos procesos se dan en mayor o menor grado en función de las características físico-químicas del compuesto. El proceso de secreción tubular se da a nivel del túbulo proximal e intervienen proteínas transportadoras en el proceso. Por el contrario, el proceso de reabsorción es un proceso pasivo en el que intervienen básicamente la lipofilia del compuesto y el grado de ionización.

En la excreción de polifenoles todos estos mecanismos son efectivos, incluso se ha evidenciado la excreción tubular para varios polifenoles (Barnes *et al.* 2011).

La vía de **excreción biliar** representa una vía de eliminación importante para aquellos compuestos que tienen una masa molecular superior a 300 g/mol, y muy significativa para aquellos con masa molecular mayor de 400 o 500, especialmente aniones y cationes orgánicos y sustancias no ionizadas que contengan grupos lipófilos e hidrófilos. Se produce por mecanismos de transporte activo, contra gradiente de concentración, lo que explica que en muchos casos se puedan encontrar concentraciones de principio activo en bilis 1.000 veces mayor que en plasma y que sea un modelo de excreción específico de la estructura de las moléculas. Los metabolitos conjugados de los principios activos administrados, se excretan en gran porcentaje por esta vía, ya que su mayor polaridad y mayor masa molecular reúnen las condiciones que favorecen la excreción biliar.

.. *Introducción*

Los polifenoles y sus metabolitos utilizan estas dos vías de eliminación siendo la vía biliar la mayoritaria para los metabolitos conjugados, y para aquellos polifenoles con pesos moleculares altos y de naturaleza polar. Por ejemplo; Chen *et al.* 1997 observó cómo tras la ingesta de té verde descafeinado la excreción de galato de epigallocatequina (EGCG: 452.37 g/mol) era muy alta por bilis, mientras que la de epigallocatequina (EGC: 306.26 g/mol) y epicatequina (EC: 290.26 g/mol), se daba simultáneamente por ambas vías, datos que ponen de manifiesto la relación secreción biliar/peso molecular. Respecto a los metabolitos, se ha visto como los metabolitos glucoconjugados se excretan mayoritariamente por bilis, mientras que los sulfoconjugados, se eliminan mayoritariamente por orina (Lohr *et al.* 1998). La **tabla 1.5**, muestra a modo de resumen estudios que reflejan el porcentaje de excreción urinaria, biliar o/y por heces de los polifenoles. Puede observarse cómo el porcentaje de excreción urinaria es alto para las flavononas de las frutas cítricas (1.1-30% de dosis administrada), e incluso mayor para flavonoles e isoflavonas (daidzeína: 35.8%). Por el contrario, la secreción biliar parece ser mayor para compuestos como genisteína (isoflavona), que para quercetina o catequina (flavonoles), pudiendo estar relacionado con el hecho de que la genisteína tiene una mayor liposolubilidad que el resto ($\log P$ 3.04, 1.81 y 1.02, respectivamente) (Drug Bank).

Tabla 1. 5. Porcentaje de polifenol excretado en orina, bilis y heces. Tipo de estudio y referencia

Referencia	Sujetos y Vía	Polifenol	% Secretado en orina	% Secretado por bilis	Presencia en heces
Sfakianos <i>et al.</i> 1997	Rata-Perfusión intestinal	Genisteína	2.4 ± 0.5	70-75	ND
Bourne and Rice-Evans, 1998	Humanos (n=5) VO	Ácido ferúlico	4.0 -5.0	ND	ND
Watanabe <i>et al.</i> 1998	Humanos (n=7) VO	Genisteína	17.6	ND	SI (2.9%)
	Humanos (n=7) VO	Daidzeína	35.8	ND	SI (4.6%)
Felgines <i>et al.</i> 2000	Rata VO	Naringenina	28	ND	ND
Erlund <i>et al.</i> 2001	Humanos (n=8) VO	Naringenina	30.2 ± 25.5	ND	ND
	Humanos (n=8) VO	Naringenina	1.1 ± 0.8	ND	ND
Walle <i>et al.</i> 2004	Humanos (n=6) VO	Resveratrol	53.4- 84.9 (aglicona y conjugados)	ND	SI (0.3-38.1%)
X. Chen <i>et al.</i> 2005	Rata VO	Quercetina	< 5	35 (conjugados)	SI (< 5%)
Boocock <i>et al.</i> 2007	Humanos (n= 40) VO	Resveratrol	0.04 (aglicona); 0.51-11.4 (formas conjugadas)	ND	SI (0-23 µg/g peso seco)
Moon <i>et al.</i> 2008	Humanos VO	Quercetina	0.05- 3.6	ND	ND
Liang <i>et al.</i> 2013	Rata (n=6) VG	Resveratrol	0.13	ND	SI (0.07%)
		Transresveratrol	1.69	ND	SI (0.99%)

VO = vía oral; VG= vía gástrica, ND = no determinado

.. Introducción.....

Ciclo entero-hepático

Tras la excreción biliar, los compuestos excretados se almacenan en la vesícula biliar y son excretados por el conducto biliar directamente hacia la luz del duodeno. Los compuestos conjugados debido a la actividad de los enzimas microbianos intestinales pueden sufrir de nuevo metabolismo y convertirse en la aglicona primaria. Estos pueden reabsorberse y volver a la circulación sistémica. A este fenómeno se le denomina **ciclo entero-hepático (figura 1.7)**. La fracción de principio activo que no se reabsorbe se elimina por las heces. La detección en heces de compuestos bioactivos es indicativa de su excreción biliar o de que no han sido absorbidos (tabla 1.5).

El ciclo entero-hepático provoca una mayor permanencia del principio activo en el organismo, y es por ello que en los perfiles de niveles plasmáticos se observan picos (doble pico), que coinciden con la reabsorción sistémica del principio activo. Sfakianos *et al.* 1997, observó la aparición de un segundo pico de concentraciones plasmáticas de genisteína a los 78 min, indicativo de este fenómeno de reabsorción, al igual que Moon *et al.* 2008, que observó este pico mientras estudiaba las concentraciones plasmáticas de quercetina tras su administración oral en humanos.

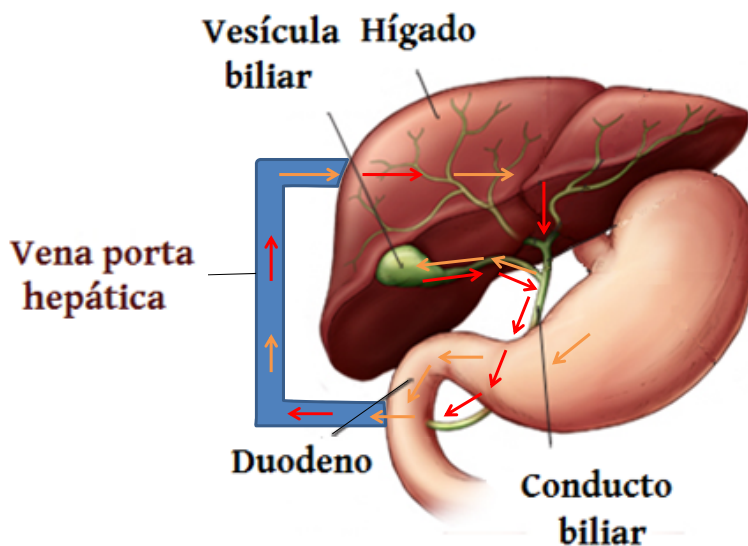


Figura 1.7. Ciclo entero-hepático

2. Absorción y biodisponibilidad

El proceso de absorción es un proceso requerido para el acceso de principios activos administrados a la circulación sistémica tras su ingesta oral. Sin embargo, aunque la fracción de dosis absorbida fuese completa, raramente el acceso a la circulación sistémica es del 100%. Existen barreras y lugares del organismo en los que se producen pérdidas del principio activo administrado hasta que éste se hace biodisponible.

Se define biodisponibilidad (F), como la magnitud y la velocidad a la que un principio activo accede a la circulación sanguínea desde su lugar de administración. Considerando un principio activo administrado en solución, su biodisponibilidad oral está directamente relacionada con el proceso cinético mediante el cual el principio activo atraviesa la membrana apical de la célula epitelial (enterocito) y la membrana basal del mismo (permeabilidad) accediendo a la circulación mesentérica y posteriormente a la sangre portal, y por tanto pasando por el hígado antes de llegar a la circulación general (**figura 1.8**).

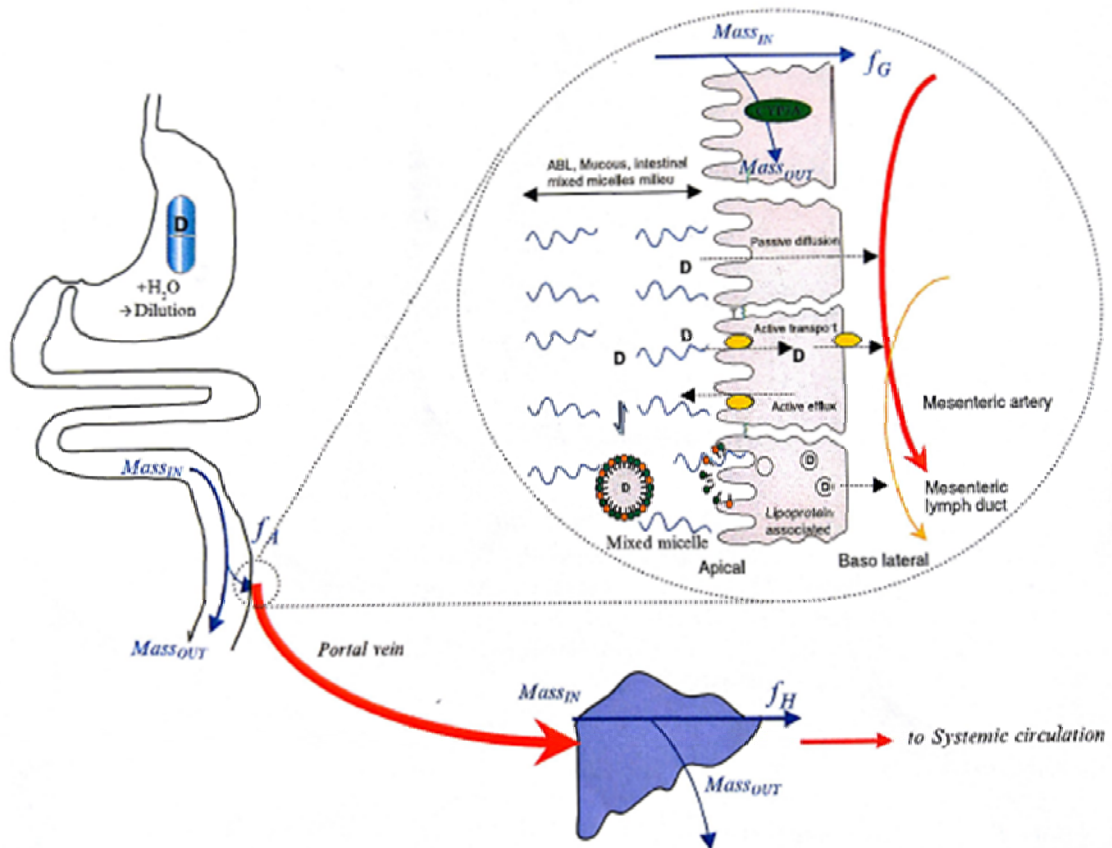


Figura 1.8. Proceso de absorción intestinal y pérdidas de principio activo antes de acceder a la circulación sistémica (Griffin y O'Driscoll, 2008).

.. Introducción ..

Por tanto, la biodisponibilidad de un compuesto tras su ingesta oral puede ser expresada como:

$$F = f_a \times f_g \times f_h \quad \text{(Ecuación 8)}$$

donde, f_a es la fracción de dosis absorbida, f_g es la fracción de principio activo que escapa del metabolismo de primer paso intestinal y f_h es la fracción de principio activo que escapa del metabolismo de primer paso hepático. También puede expresarse en términos de tasa de extracción (intestinal E_g y hepática E_h):

$$F = f_a \times (1 - E_g) \times (1 - E_h) \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Por tanto la determinación y/o conocimiento de la fracción de dosis absorbida, y las causas que producen pérdidas del principio activo respecto a la dosis administrada, pueden conducir a estrategias para conseguir aumentar la biodisponibilidad de los compuestos administrados. Ésto resulta de gran interés si queremos obtener el máximo rendimiento de la dosis administrada/ingerida, y si asumimos que ése compuesto “inalterado” es el responsable del efecto terapéutico o bioactivo esperado.

Tal como se ha comentado anteriormente, la absorción oral es un proceso complejo en el que intervienen numerosos factores fisicoquímicos, fisiológicos y otros relacionados con la matriz (**Tabla 1.1**). De una forma resumida, Amidon *et al.* 1995 identificó a dos como los factores principales que determinan la absorción oral de los principios activos, la solubilidad y la permeabilidad, estableciendo el sistema de clasificación biofarmacéutica de los fármacos (BCS, *biopharmaceutical classification system*). De acuerdo con esta clasificación, los fármacos quedaron agrupados en 4 clases en función de estos parámetros (**figura 1.9**).

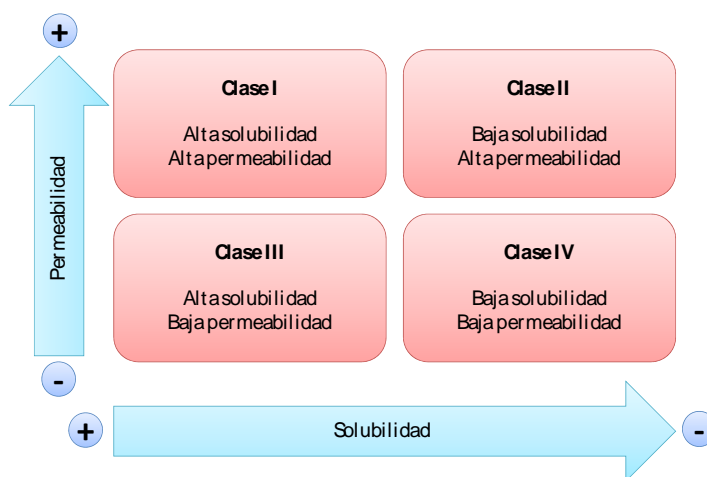


Figura 1.9. Clasificación BCS de los fármacos.

Un compuesto perteneciente a la clase I no es de esperar que presente problemas en su absorción ni por su solubilidad ni por su permeabilidad, pero en otros casos permitiría entre otros aspectos, diseñar estrategias para modificar alguna de estas propiedades (forma química, tamaño partícula, matriz, etc).

Esta clasificación ha sido acogida por las administraciones europea (EMA, *European Medicines Agency*) y americana (FDA, *Food and Drug Administration*) y establece la posibilidad de reemplazar los estudios realizados *in vivo* (bioequivalencia) por ensayos *in vitro* (bioexención), siempre y cuando el principio activo reúna ciertas condiciones especificadas en las guías, como por ejemplo pertenecer a la clase I o II y que se presente como una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata. A su vez establece los criterios por los que una determinada sustancia puede ser considerada de alta/baja solubilidad/permeabilidad, así como el tipo de estudios que deben realizarse para ser determinados.

Solubilidad

Según el informe de la EMA (2010) y el borrador de la FDA (mayo 2015), un principio activo se considera de alta solubilidad cuando la dosis más alta a administrar es soluble en 250 mL de un medio acuoso en los ámbitos de pH 1-6.8 a 37 °C, es decir, aquella que es soluble a lo largo de todo el tracto gastrointestinal. Para ello se requiere la determinación de la solubilidad en al menos tres pH, preferiblemente a pH 1.2, 4.5 y 6.8, y al pH=pKa de la sustancia cuando éste se halle comprendido en este margen de pHs. La FDA concreta los pH a ensayar como: pH=pKa, pH=pKa+1, pH=pKa-1, pH=1 y pH=6.8.

Permeabilidad

En el caso de la permeabilidad, las dos administraciones difieren un poco más, no en cuanto al concepto de permeabilidad (un producto será altamente permeable cuando presente absorción completa, es decir $f_a \geq 85\%$), sino en cuanto a los métodos aceptados para su determinación (dentro del contexto del registro de una especialidad farmacéutica). La EMA solicita estudios de biodisponibilidad absoluta o bien estudios de balance de masas en el hombre, y acepta como soporte a éstos estudios *in vitro* en células Caco-2 utilizando estándares de referencia. Por el contrario, la FDA opta por estudios de transferencia de masa a través del epitelio intestinal humano como preferentes, pero admite también otras metodologías que hayan demostrado ser capaces de predecir la fracción de dosis absorbida en humanos (**figura 1.10**); es decir admite estudios de absorción *in situ* en animal de experimentación y en cultivos celulares (Caco-2).

En dos los casos habría que demostrar estabilidad del compuesto en el tracto gastrointestinal.

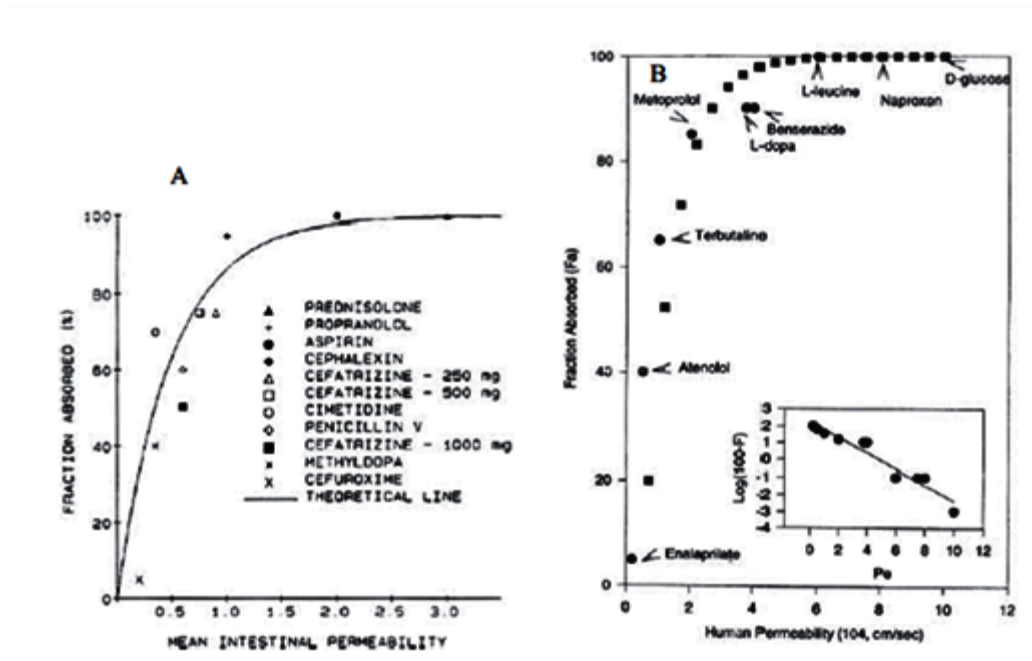


Figura 1.10. Fracción de dosis absorbida en humanos vs. permeabilidad intestinal en la rata (A) y vs. permeabilidad intestinal en humanos (Griffin y O'Driscoll, 2008).

3. Coeficiente de permeabilidad efectivo: fundamento y métodos de estudio

El coeficiente de permeabilidad efectivo (P_{eff} , cm/s) es una herramienta biofarmacéutica que permite predecir la fracción de dosis absorbida en humanos.

El proceso de absorción de primer orden (Ecuación 4) mencionado anteriormente, está directamente relacionado con el coeficiente de permeabilidad efectivo mediante la siguiente ecuación:

$$K_a = \frac{A}{V} \cdot P_{eff} \quad \text{(Ecuación 10),}$$

donde A es la superficie o área de absorción ($2 \cdot \pi \cdot R \cdot L$) y V el volumen ($\pi \cdot R^2 \cdot L$). Dicho parámetro deriva de la primera ley de difusión de Fick:

$$J_{wall} = P_{eff} \cdot \Delta C \quad \text{(Ecuación 11)}$$

en la que J_{wall} es el flujo neto o masa (M) por unidad de área (A) y tiempo (t), y ΔC el gradiente de concentración a través de la membrana. De acuerdo con esto, otra expresión para el J_{wall} es:

$$J_{wall} = \frac{dM}{dt} \cdot \frac{1}{A} \quad \text{(Ecuación 12).}$$

A partir de esta ecuación se puede despejar la velocidad obteniéndose:

$$\frac{dM}{dt} = A \cdot J_{wall} \quad (\text{Ecuación 13}).$$

Combinando las **ecuaciones 11 y 13** se obtiene:

$$\frac{dM}{dt} = A \cdot P_{eff} \cdot \Delta C \quad (\text{Ecuación 14});$$

que en condiciones sink quedaría:

$$\frac{dM}{dt} = A \cdot P_{eff} \cdot C_{lumen} \quad (\text{Ecuación 15}).$$

Esta es la ecuación de partida que permite determinar el coeficiente de permeabilidad utilizando diferentes metodologías: modelos de perfusión en humanos, modelos de perfusión en animal de experimentación y modelos en cultivos celulares (células Caco-2), mayoritariamente. De las tres mencionadas, el modelo de perfusión en humanos es el modelo prioritario, sin embargo, por motivos éticos principalmente, y otros de tipo económico y racional obligan a plantear otros métodos alternativos que permitan obtener una información extrapolable a los humanos.

El cálculo del coeficiente de permeabilidad efectivo a partir de los modelos de perfusión se basa en un balance de masas y considerando un modelo fisiológico (**figura 1.11**), en el que el intestino viene representado por un cilindro de longitud L y radio R , al que accede la sustancia a absorberse a una determinada velocidad de entrada ($\phi \cdot C_{in}$) y del que sale a otra velocidad de salida ($\phi \cdot C_{out}$):

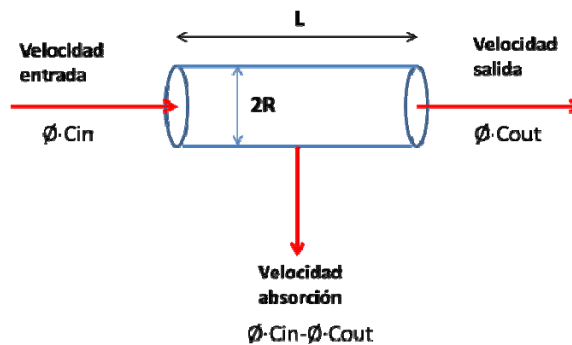


Figura 1.11. Modelo de balance de masas para experimentos de perfusión intestinal. ϕ =flujo (mL/min); C_{in} y C_{out} concentración de entrada y salida del principio activo, respectivamente.

De acuerdo con la **ecuación 15** se puede escribir:

$$\phi \cdot C_{in} - \phi \cdot C_{out} = 2 \cdot \pi \cdot R \cdot L \cdot P_{eff} \cdot C_{out} \quad (\text{Ecuación 16});$$

Despejando P_{eff} se obtiene:

.. *Introducción*

$$P_{eff} = \frac{\phi_{in} \cdot (C_{in} - C_{out})}{C_{out} \cdot 2 \cdot \pi \cdot r \cdot L} \quad \text{(Ecuación 17)}$$

Esta ecuación se basa en el llamado modelo bien agitado (*well-stirred model* o *mixing tank model*) y la **ecuación 17** es la que se usa para calcular el coeficiente de permeabilidad en humanos. Para el caso en que la determinación se realice en animal (rata/ratón) el modelo que se utiliza es modelo de tubo paralelo (*parallel tube model* o *complete radial mixing model*). La diferencia fundamental entre los dos modelos se basa en cómo la concentración de fármaco se desplaza y agita en el interior del cilindro (intestino): en el primer caso y dado que se estudia en un cilindro cerrado, se considera una agitación axial y radial con concentración uniforme en el interior del intestino. En el segundo, dado que el intestino es un sistema abierto, el perfil de concentración se considera constante radialmente pero no axialmente. En este caso, la estimación del coeficiente de permeabilidad se realiza mediante la ecuación siguiente:

$$P_{eff} = \frac{-\phi_{in} \cdot L \cdot \ln \frac{C_{out}}{C_{in}}}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L} \quad \text{(Ecuación 18)}$$

Por otro lado, la fracción de dosis absorbida en estado de equilibrio puede determinarse de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f_a = 1 - \left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \right) \quad \text{(Ecuación 19)}$$

A partir de la **ecuación 18** y considerando el porcentaje absorbido, éste se calcularía mediante la siguiente ecuación:

$$\left[1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \right] \cdot 100 = \left[1 - e^{-\frac{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L \cdot P_{eff}}{\phi}} \right] \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 20)}$$

Cabe comentar que el valor de la concentración luminal del permeante (C_{out}) puede modificarse debido a procesos de absorción y secreción de agua durante el estudio, y no debido a la absorción del permeante propiamente dicho. Por este motivo, debe utilizarse algún método para la corrección de las concentraciones de salida en función de este flujo de agua. Hay dos metodologías posibles, el método gravimétrico (Sutton *et al.* 2001) o bien la coperfusión junto al permeante de un marcador no absorbible como el rojo de fenol, la inulina o el ^{14}C PEG 4000. De acuerdo con el método gravimétrico, las concentraciones luminales de salida se corrigen de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_{out\ corr} = C_{out} \cdot \frac{\phi_{out}}{\phi_{in}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

donde ϕ_{in} y ϕ_{out} son el flujo de perfusión de entrada y de salida, respectivamente.

Por el método del marcador no absorbible, la corrección se realiza aplicando la **ecuación 22**

$$C_{out\ corr} = C_{out} \cdot \left(\frac{C_{\text{marcador}\ in}}{C_{\text{marcador}\ out}} \right) \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde $C_{\text{marcador}\ in}$ y $C_{\text{marcador}\ out}$ son las concentraciones del marcador a la entrada y a la salida del intestino.

Métodos de estudio de la absorción

Tal como se expone en la **figura 1.12**, son numerosos los métodos que existen para estudiar la absorción/permeabilidad de un principio activo candidato de ser administrado por vía oral. Cada una de estas metodologías presenta una serie de ventajas e inconvenientes, y en algunos casos conviene combinar varias de ellas. Sin embargo nos centraremos en dos metodologías recomendadas por las Administraciones: métodos de perfusión intestinal en humanos y en animales.

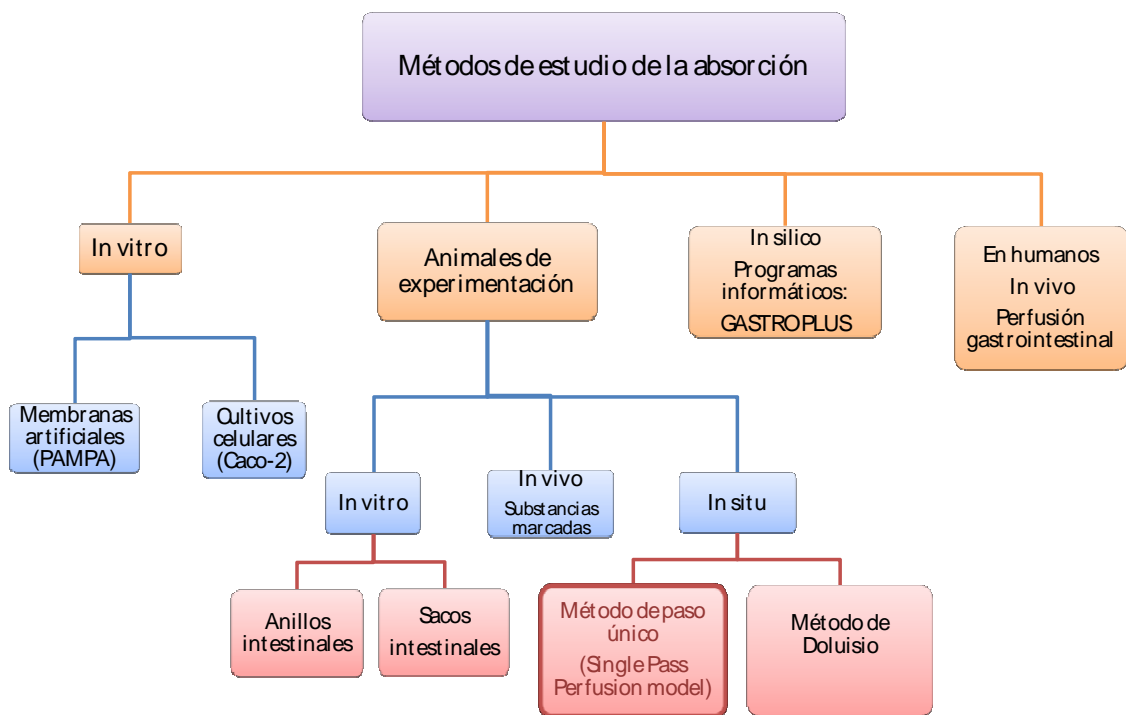


Figura 1.12. Métodos de estudio de la absorción.

.. Introducción.....

La **figura 1.12** organiza los diferentes métodos de estudio de la absorción, sobresaltando el ensayo *in situ* de perfusión intestinal, es cuál es el elegido en la presente tesis doctoral para conocer las características de absorción de los flavonoides estudiados.

Método de perfusión intestinal en humanos

Existen otros métodos para estudiar la absorción de sustancias administradas, como los métodos de deconvolución basados en un balance de masas (Wagner-Nelson, Loo-Riegelman), o bien el método de los residuales basado en un análisis compartimental de datos de concentración plasmática en función del tiempo. Sin embargo, estos métodos no permiten estudiar de manera explícita el transporte a través del epitelio intestinal. El método de perfusión intestinal *in situ* permite determinar la permeabilidad intestinal a través de la membrana.

El método de perfusión intestinal en humanos requiere de un período de ayunas de al menos 10 h y utiliza el dispositivo Loc-I-Gut™ (**figura 1.13**). El sistema dispone de una sonda multicanal (6 canales) y de dos balones de látex hinchables separados entre ellos 10 cm que permiten aislar una zona del yeyuno donde realizar el ensayo, y constituyendo así un sistema cerrado, donde la hidrodinámica del fluido que perfunde estaría descrita por el modelo *bien agitado* anteriormente mencionado (*well-stirred model*).

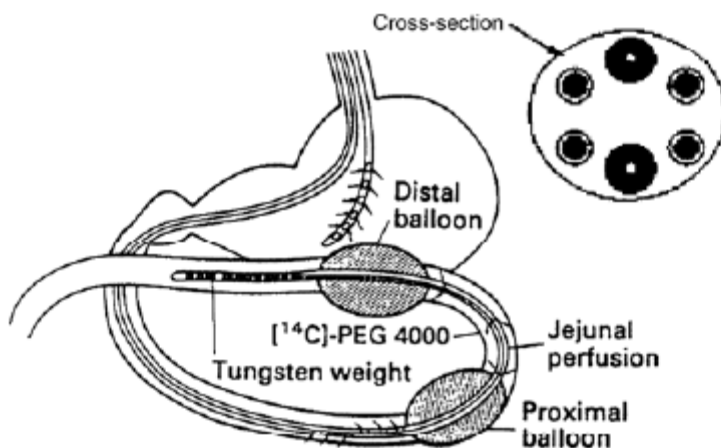


Figura 1.13. Modelo de perfusión intestinal en el hombre (Lennernäs et al. 1992).

La solución a ensayar se perfunde a una velocidad de 2-3 mL/min por dos de las sondas (una para perfundir y otra para recoger la muestra). Por las otras dos sondas se perfunde el marcador no absorbible. La perfusión se realiza por dos períodos de 100 min, y entre ambos períodos el segmento intestinal se lava con 120 mL de suero fisiológico (Takamatsu *et al.* 1997). En cada período se recogen muestras cada 10 min, y una vez alcanzado el equilibrio (es decir, cuando la

concentración de salida es estable en el tiempo, $C_{out}/C_{in} = cte$) (~30-50 min) se calcula el coeficiente de permeabilidad de acuerdo con la **ecuación 17**.

Dada la complejidad del método, los costes económicos y aspectos éticos derivados del estudio realizado en humanos, no permite ser utilizado de forma rutinaria en los estudios de absorción, y por ello se requiere disponer de métodos alternativos, tal como el que se expone a continuación.

Método de perfusión intestinal de un solo paso (Single Pass Perfusion model)

Este método, al igual que el método de Doluisio (Doluisio *et al.* 1969) o llamado también *Closed loop intestinal perfusion technique*, suele llevarse a cabo en rata, aunque algunos estudios han sido realizados en ratón (Mols *et al.* 2009, Escribano *et al.* 2012). En ambos casos es importante mantener el animal en condiciones fisiológicas adecuadas (37 °C y con buena perfusión sanguínea) para poder obtener resultados de absorción y/o metabolismo fiables. Además requiere de un período de ayunas del animal de aproximadamente 12 h (con agua *ad libitum*). La principal diferencia entre ambas técnicas radica en que el *single pass perfusión model* es un sistema abierto (*Open loop*) mientras que el método de Doluisio es un sistema cerrado en el que se aísla un segmento del intestino en el que se introducen 10 mL de la solución problema a estudiar. Aunque ambas técnicas dan resultados similares, el método de perfusión de un solo paso refleja más las condiciones *in vivo*, es más reproducible y da lugar a menor variabilidad entre experimentos (Schurgers *et al.* 1986).

La técnica de perfusión de un solo paso consiste en practicar una laparotomía al animal para identificar el tramo del tracto gastrointestinal en el que se va a realizar el estudio. Si se trata del intestino delgado, se insertan dos cánulas en forma de L, una al inicio del duodeno y la otra en el ileon (aproximadamente 10 cm de segmento intestinal) que se fijan mediante una ligadura. A su vez la cánula duodenal se une a una tubuladura de polietileno que conectará con una bomba de perfusión (**figura 1.14**). Una vez limpio el intestino se perfunde la solución problema a una velocidad comprendida entre 0.1 y 0.3 mL/min, y se recogen muestras a la salida del intestino (C_{out}) cada 10 min durante 60 min. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se calcula el coeficiente de permeabilidad mediante la ecuación correspondiente al modelo paralelo (**ecuación 18**). Es conveniente ligar el conducto biliar para prevenir un posible ciclo entero-hepático.

La técnica descrita permite escoger la zona gastrointestinal en la que se quiere estudiar la permeabilidad. Frecuentemente la absorción se estudia en el intestino delgado, pero puede ser también de interés estudiarla en el estómago y en el colon. La **figura 1.15** muestra estas tres zonas.

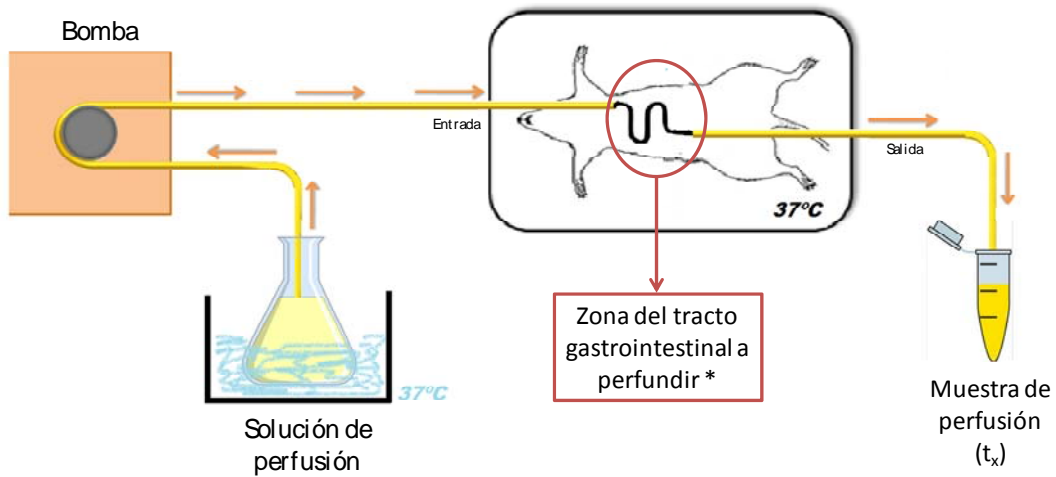


Figura 1.14. Método de perfusión gastrointestinal in situ en ratón. *La zona a perfundir es específica de cada modelo a estudio.

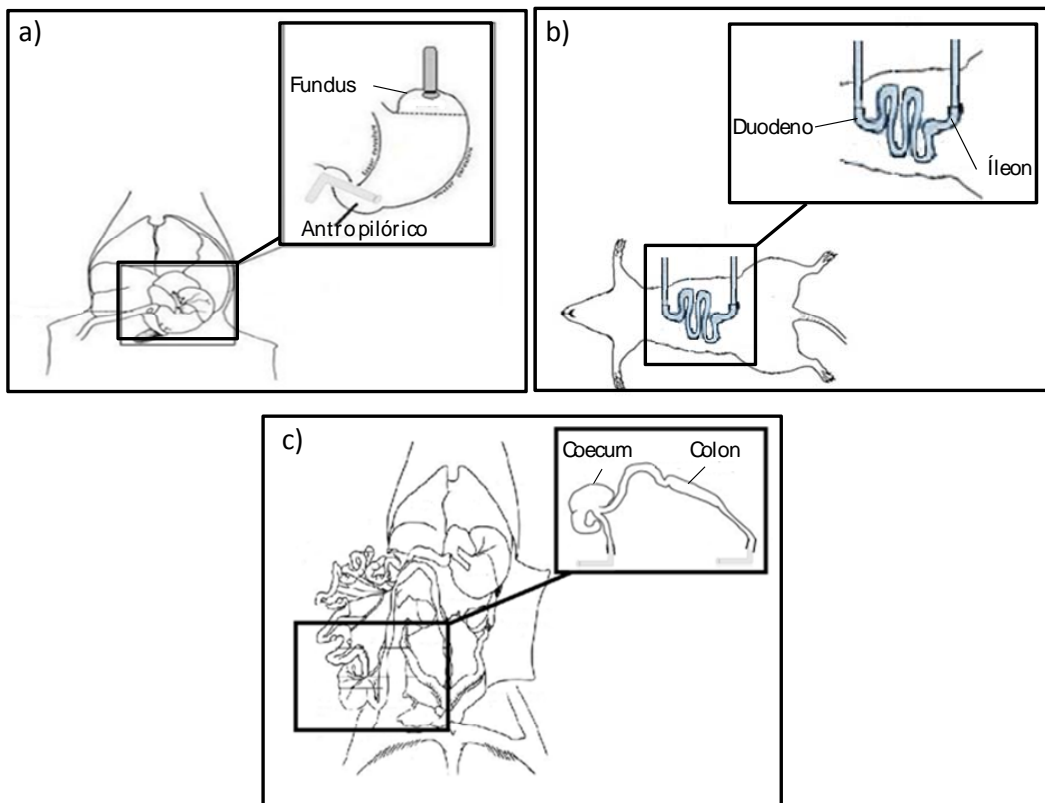


Figura 1.15. Zonas de perfusión. a) Estómago, b) Intestino delgado y c) Colon.

Mediante esta técnica el aporte neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona en estudio permanece bastante íntegra. Por otra parte, esta técnica *in situ* no solo permite obtener muestras de perfusión intestinal (luminales), sino que también permite obtener muestras de bilis y sangre. Las muestras de sangre pueden recogerse a distintos tiempos de la circulación mesentérica (Mols *et al.* 2009), o bien de manera puntual al finalizar el experimento mediante punción cardíaca.

4. El tomate (*Solanum lycopersicum*)

4.1. Historia, consumo y producción

Originario de América del Sur, probablemente en una zona ubicada entre Chile y Colombia, donde crecía de forma silvestre, se comenzó a cultivar en México en el siglo XVI como producto alimenticio. A Europa llegó en la misma época, en principio como una especie ornamental, debido a su asociación con un alcaloide venenoso: “la tomatina”, pero poco después y al comprobarse su inocuidad, se comenzó a consumir en las zonas mediterráneas europeas, como España, Italia y Portugal. En países como Francia y Alemania no se introdujo como un componente de la dieta diaria hasta el siglo XIX. Fue difundido por los españoles y portugueses hacia Oriente Medio y África, así como Filipinas desde donde se extendió a otros países asiáticos. También desde Europa, llegó a Estados Unidos y Canadá.

Actualmente, el tomate constituye la hortaliza más consumida tanto en Europa como en Estados Unidos, por detrás de la patata (Lugasi *et al.* 2003; Luthria *et al.* 2006), así como uno de los vegetales más cultivados mundialmente; tanto es así que en 2012 la producción mundial de esta hortaliza se incrementó en un 2.2 por ciento con respecto al año anterior, continuando con su línea ascendente año tras año. Según la división de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), los altos datos de producción y consumo, se deben en parte a su fácil accesibilidad y su precio asequible (FAOSTAT, 2012).

China es el primer productor de tomate del mundo (con más de 50 millones de toneladas) seguido de India, Estados Unidos, Turquía y Egipto. España ocupa el octavo lugar, justo detrás de Italia, con una producción creciente en el año 2012 de algo más de 4 millones de toneladas (1.83% del total). En España la producción del tomate se sitúa principalmente en Almería, con un 35% de la producción nacional según los datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2013).

En cuanto al destino de la producción, más del 60% se destina a consumo fresco y el resto a la industria para su procesamiento y posterior producción de zumos, salsas, purés, pastas y tomates enlatados. En 2010 se utilizaron 2.300.000 toneladas de tomate fresco en la industria. Se exporta aproximadamente un 25% de la producción, unas 880.630 toneladas anuales de acuerdo con los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*).

4.2. Composición y valor nutricional

El tomate no solo es un componente importante de la dieta mediterránea, sino que también constituye un ingrediente fundamental de otras dietas. Los tomates tienen un valor energético de 27 Kcal por ración de 149 g, la piel y las semillas constituyen el 1% del fruto. La materia seca oscila entre un 5% y un 10%, de las cuales la mayoría son azúcares (22% glucosa y 25% fructosa); el resto está constituido por fibras dietéticas (pectina, celulosa y hemicelulosa), carotenos, vitaminas y lípidos (Salles, 2003), siendo una fuente importante de nutrientes (**figura 1.16**).

Además, así como otras frutas y hortalizas, el tomate contiene distintos compuestos bioactivos procedentes del metabolismo secundario de las plantas como carotenos y compuestos fenólicos o polifenoles. El contenido de antioxidantes del tomate no solo depende de sus factores genéticos, sino también de la madurez, y de las condiciones agrónomas y medioambientales a los que está expuesto (Davies y Hobson, 1981; Dumas *et al.* 2003).

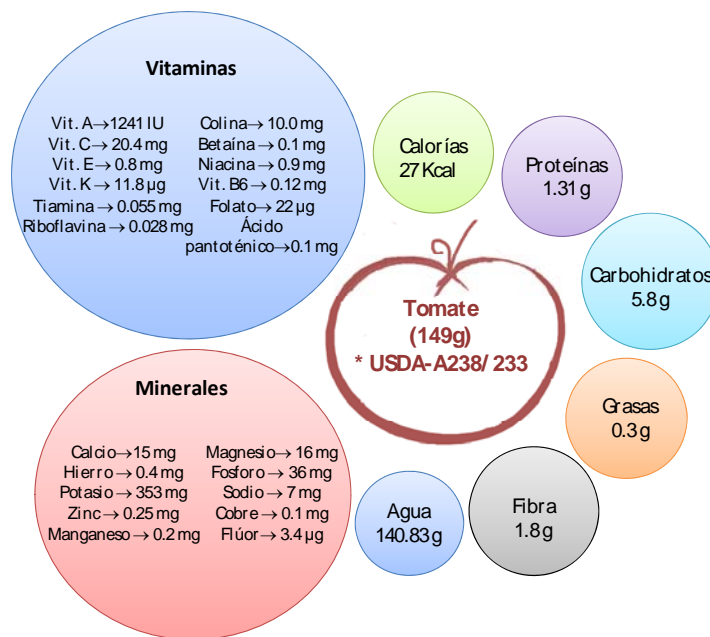


Figura 1.16. Composición nutricional de una taza de tomate cherry (149g) (USDA, 2015)

4.3. Compuestos bioactivos

Los **compuestos bioactivos**, son compuestos que producen una actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en un beneficio para la salud. Estudios epidemiológicos confirman que la presencia de distintos compuestos bioactivos como carotenoides, ácido ascórbico, tocoferol y compuestos fenólicos son responsables de un efecto preventivo a padecer enfermedades crónicas degenerativas como cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes e

incluso se ha observado una mejora en el tratamiento de la hepatitis C. Es por ello, que el consumo de tomate se considera como un factor nutricional indicativo de buenos hábitos alimentarios, y un estilo de vida saludable (Giovannucci, 2005; Prabhakar *et al.* 2014; Ravishankar *et al.* 2013; Willcox *et al.* 2008; Yoshimura *et al.* 2009).

4.3.1. Carotenoides

El licopeno y el β -caroteno son los pigmentos carotenoides más prevalentes del tomate; el contenido de licopeno es del 80-90%, mientras que el β -caroteno solo representa el 7-10% del total de carotenoides.

El contenido de licopeno depende del estado de maduración, la variedad del tomate y las condiciones del cultivo y es el responsable del color rojo de la fruta (Martínez-Valverde *et al.* 2002). Los niveles de licopeno obtenidos en diferentes estudios varían entre un 4.5 y un 6.3 mg/100 g (Willcox *et al.* 2003). La principal fuente de licopeno en la dieta es el tomate y el puré de tomate, que aportan el 42 y el 71.6%, respectivamente (O'Neill *et al.* 2001).

El β -caroteno es un precursor de la vitamina A necesaria para el buen funcionamiento ocular, reproductivo y ayuda a la formación y al mantenimiento de dientes, tejidos blandos y óseos, membranas mucosas y piel. No todo el β -caroteno se transforma en vitamina A; es este remanente que se queda en el hígado el que posee actividad antioxidante, capaz de eliminar los radicales libres. La concentración de β -caroteno en el tomate oscila entre los 0.8 y 1.6 mg/100 g de tomate fresco (Baranska *et al.* 2006).

4.3.2. Polifenoles

Los polifenoles son un complejo grupo de moléculas caracterizadas por poseer un grupo fenol en su estructura. Se encuentran en la mayoría de los vegetales y provienen de su metabolismo secundario. Se ocupan de la defensa de las plantas, protegiéndolas de la radiación ultravioleta, el estrés oxidativo y las agresiones por otros patógenos gracias a su acción antioxidante entre otras cosas. Son los compuestos que otorgan las características sensoriales a las frutas y hortalizas, como por ejemplo, el olor, el sabor, la amargura o la estabilidad respecto a la oxidación.

Todos los compuestos fenólicos emanan de los mismos intermediarios, la fenilalanina o del ácido shiquimico (Crozier *et al.* 2009; Pandey y Rizvi, 2009). Se encuentran mayoritariamente en forma libre, soluble o insoluble, unidos a la fibra del tomate, sobre todo en la piel. Kähkönen *et al.* 1999 informó que el contenido total de polifenoles en el tomate es mayor de 200 mg del equivalente de ácido gálico por 100 g de producto seco. El consumo medio de polifenoles en la dieta se encuentra entre unos 20-1000 mg/día (Rice-Evans *et al.* 1996).

.. Introducción ..

Un ejemplo representativo de la composición cualitativa y cuantitativa de los principales polifenoles en el tomate se expone en la **tabla 1.6** (Martínez-Huélamo *et al.* 2015). Tal como se puede observar la naringenina se presenta mayoritariamente como aglicona, mientras que la quercetina se encuentra glucosilada (rutina).

Tabla 1.6. Compuestos identificados y cuantificados en tomates frescos y en dos tipos de salsa de tomate, con o sin aceite de oliva refinado. Tabla modificada de Martínez-Huélamo *et al.* 2015.

Compuesto	Tomates frescos (ng/g FW)	Salsa OF (ng/g FW)	Salsa ROOE (ng/g FW)
Ácido 3-cafeoilquinico	113.3 ± 5.9 ^b	443.8 ± 5.8 ^a	419.6 ± 121.0 ^{a,b}
Ácido 5-cafeoilquinico	2424.2 ± 98.0 ^a	1575.9 ± 48.3 ^b	1744.7 ± 65.2 ^b
Ácido 4-cafeoilquinico	1495.4 ± 2.2	1197.3 ± 46.7	1356.5 ± 64.4
Áido dicafeoilquinico	429.4 ± 15.9 ^a	174.2 ± 5.9 ^b	177.3 ± 9.8 ^b
Ácido caféico	796.6 ± 11.2	762.6 ± 30.9	740.7 ± 21.4
Hexosa de ácido cafeico	1286.3 ± 50.0	1401.4 ± 31.0	1749.8 ± 84.5
II hexosa de ácido caféico	568.9 ± 27.3	459.6 ± 16.8	422.2 ± 10.0
Hexosa de ácido ferúlico	488.8 ± 25.0	441.1 ± 21.6	435.7 ± 7.6
Ácido protocatecauto	41.4 ± 1.0 ^b	146.1 ± 3.0 ^a	154.4 ± 3.8 ^a
Ácidos fenólicos administrados por vía oral (µg)*	3822.2	1650.5	1782.7
Naringenina	503.2 ± 32.1 ^b	3386.6 ± 122.3 ^a	3823.7 ± 216.7 ^a
Naringenin-7-O-glucósido	ND ^b	215.9 ± 6.6 ^a	221.3 ± 13.3 ^a
Flavonoides administrados por vía oral (µg)*	251.6	868.1	1011.3
Rutina	2538.1 ± 125.2 ^b	5950.5 ± 302.6 ^a	4923.7 ± 247.4 ^a
Flavonoles administrados por vía oral (µg)*	1269.1	1487.6	1230.9

OF = sin aceite, ROOE = Enriquecido con aceite de oliva refinado, FW = peso fresco, ND = no detectado

* Correspondiente a una dosis única administrada a los sujetos de 500 g (tomate) 250 g salsa

Resultados expresados en promedio ± SD (desviación estándar).

Los valores en filas con diferentes letras son significativamente diferente ($P < 0.05$)

La clasificación de los polifenoles se basa en su estructura química, respecto al número de grupos fenol que contengan y en la forma en la que se unen estos anillos. Los grupos más importantes los constituyen los flavonoides, ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), estilbenos y lignanos (**figura 1.17**) (Pandey y Rizvi, 2009; Scalbert *et al.* 2002).

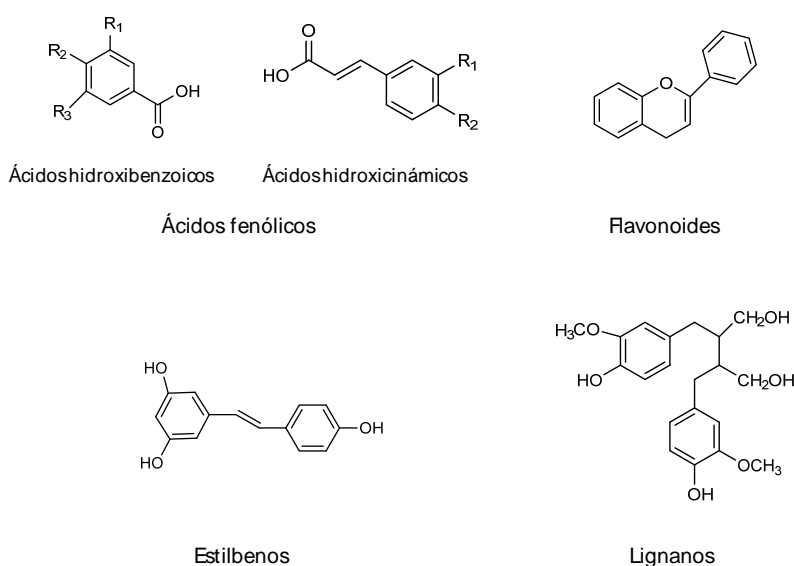


Figura 1.17. Clasificación de los polifenoles. Modificado de Pandey y Rizvi, 2009.

Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles formados por 15 átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un enlace de 3 carbonos (C6-C3-C6) (**figura 1.18**). El anillo aromático B y la cadena que constituyen el fenilpropanol se sintetiza del p-coumaroil-CoA y el anillo A proviene de la condensación de dos unidades de acetato vía ácido malónico. Se dividen en subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonoles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas (Crozier *et al.* 2009). En la **figura 1.18** se muestran las estructuras químicas básicas de cada grupo.

Los compuestos que forman cada grupo de los flavonoides se distinguen según el número y la disposición de los grupos hidroxilo, o de la magnitud de la alquilación y/o glicosilación. Cada compuesto tiene unas características físico-químicas diferentes relacionadas con los sustituyentes de su estructura; por ejemplo, los grupos hidroxilo aumentan su hidrosolubilidad, mientras que los grupos metilo e isopentilo les confieren mayor liposolubilidad. En las plantas se pueden encontrar tanto en forma libre (o agliconas), como unidos a azúcares formando heterósidos; este azúcar también es el responsable de un aumento en su solubilidad acuosa (Crozier *et al.* 2009). Se han identificado más de 4.000 variedades de flavonoides, la mayoría de ellas responsables del color de las flores, frutas y hojas. En el tomate los flavonoides se sintetizan y se mantienen sobre todo en la piel. Las variantes del tomate más pequeñas son las que mayor cantidad de flavonoides poseen; por ejemplo los tomates cherry tienen una concentración promedio de 30 µg/g, mientras que las variantes más grandes contienen unos 5 µg/g (Willcox *et al.* 2003).

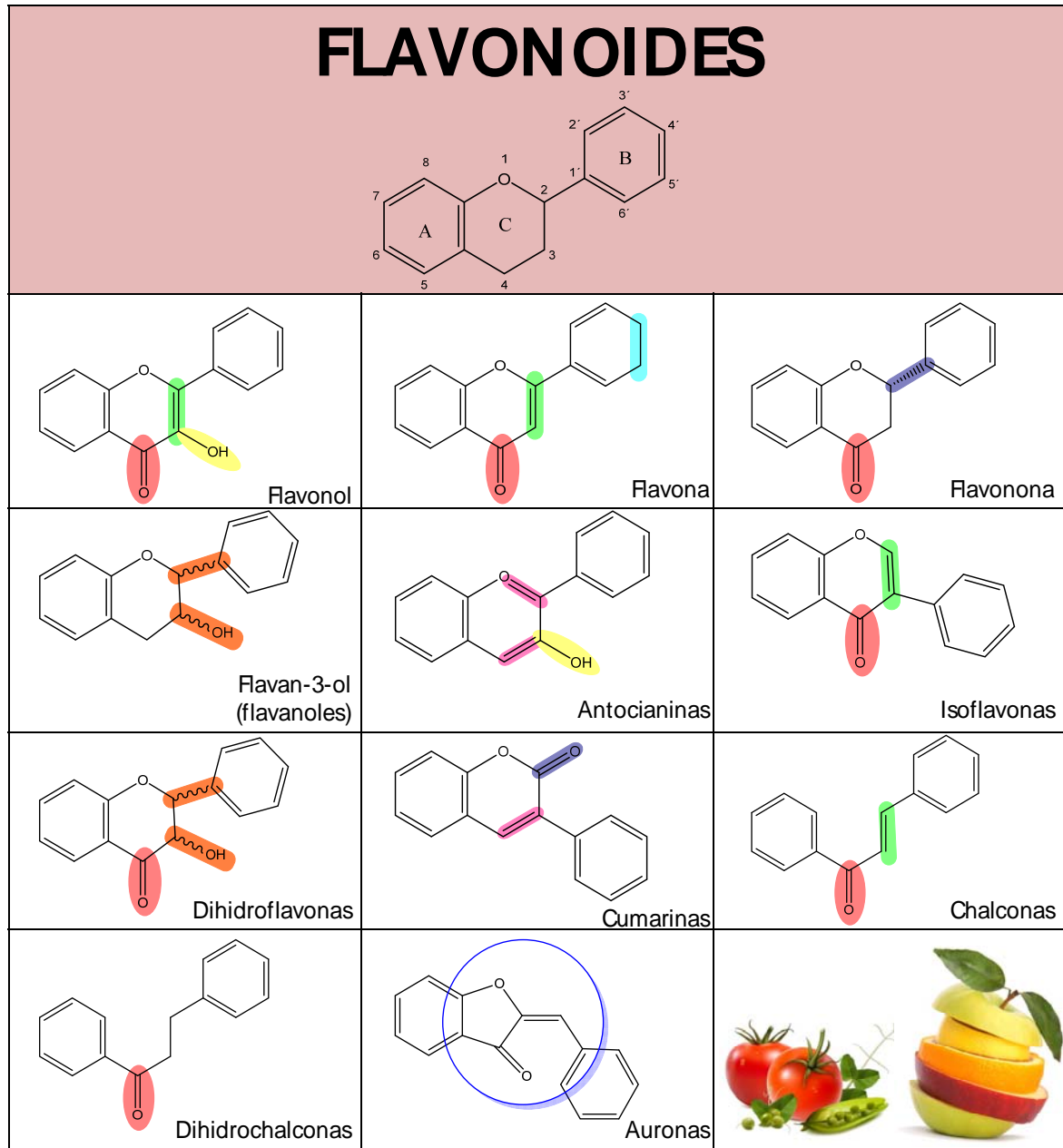


Figura 1.18. Clasificación de los flavonoides

Los principales grupos de flavonoides presentes en el tomate son los flavonoles y las flavanonas.

Los flavonoles mayoritarios del tomate son la quercetina (**figura 1.19a**) y el kaempferol (Vallverdú-Queralt *et al.* 2011a). El contenido de quercetina varía según la variedad, el tamaño y el país de origen, por ejemplo los tomates cherry que provienen de climas cálidos y soleados contienen las mayores cantidades (Sahlin *et al.* 2004). La maduración del tomate también es un factor a tener en cuenta: cuanto más maduro menos cantidad de quercetina (Nicoletti *et al.* 2007; Raffo *et al.* 2002)

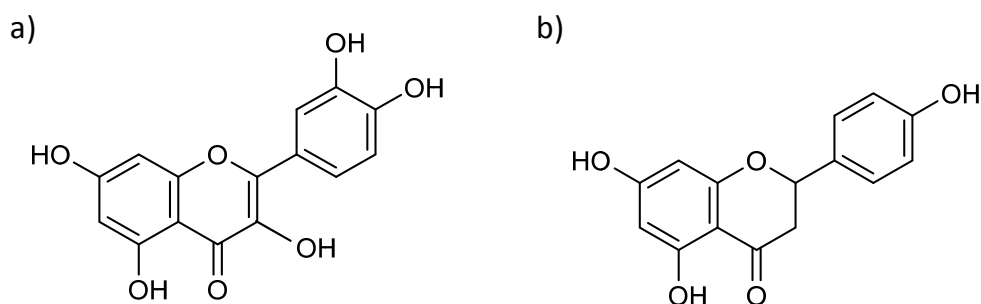


Figura 1.19. a) Estructura de la quercetina (flavonol); b) Estructura de la naringenina (flavonona)

En el tomate, la flavonona más abundante es la naringenina (**figura 1.19b**). Su concentración varía entre los 8 y los 42 mg/kg (Bugianesi *et al.* 2004). Al igual que la quercetina, la concentración de la naringenina varía según la madurez del fruto, pero en este caso a mayor madurez mayor contenido de naringenina (Nicoletti *et al.* 2007; Raffo *et al.* 2002).

Tal como puede observarse en la figura, estructuralmente la naringenina solo se diferencia de la quercetina en la falta de un grupo hidroxilo en la posición dos del grupo fenilo y en la falta de doble enlace y del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo de benzopirona.

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran en muchos alimentos y se dividen en dos clases: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los hidroxibenzoicos. En el tomate normalmente se encuentran unidos a ésteres y su distribución depende de la variedad de la fruta, pudiendo encontrarse tanto en el cuerpo como en la piel. Diversos autores han estudiado las concentraciones de los distintos ácidos hidroxicinámicos del tomate. Martínez-Valverde *et al.* 2002 en tomates de cultivo español observó que el ácido clorogénico era el más abundante, con unos valores de 14-32 mg/kg de producto fresco, seguido del ácido caféico con unos valores de 1.39-13 mg/kg, mientras que el

ácido ferúlico y el *p*-cumárico mostraron valores similares y por debajo de los 5 mg/kg. Las mismas relaciones las encontraron Luthria *et al.* 2006 y Minoggio *et al.* 2003.

Estilbenos

Los estilbenos contienen dos fenilos unidos por un metileno. No son muy abundantes en la dieta pero si resultan de gran importancia, debido a los efectos beneficiosos atribuidos al resveratrol, un compuesto que presenta importantes efectos anticancerígenos y antiinflamatorios. Está presente en gran cantidad en el vino tinto (1.90 mg/L) aunque también se encuentra en vino rosado (0.41 mg/L) y vino blanco (0.13 mg/L) en menor concentración (Anton *et al.* 2014; Fernández-Mar *et al.* 2012).

Lignan

Hay muchas clases de lignanos, pero todos ellos poseen una característica estructural común: están formados por dos unidades de fenilpropano unidas por un átomo central a sus cadenas laterales. En el tomate los lignanos se hallan a baja concentración como el enterodiol y la enterolactona (10 y 11 µg/100 g tomate fresco, respetivamente) (Tetens *et al.* 2013; Thompson *et al.* 1991).

Dado que la naringenina y quercetina son los flavonoides mayoritarios del tomate (Marinez-Huelamo *et al.* 2015), la investigación de esta tesis se ha centrado en estos dos compuestos.

5. Naringenina y Quercetina

5.1. Características físico-químicas de la naringenina y la quercetina

Las principales características físico-químicas de la naringenina y de la quercetina que pueden tener repercusión significativa en la permeabilidad de los compuestos se presentan en la **tabla 1.7**. Ambos tienen bajo peso molecular y alta lipofilia (expresada en log *P*), propiedades que favorecen la difusión pasiva a través de la membrana lipídica. Además presentan menos de 5 grupos donadores de puentes de hidrógeno, y menos de 10 grupos aceptores de puentes de hidrógeno, características también favorables para su absorción (Lipinski *et al.* 1997).

Tabla 1.7 Características físico-químicas de la naringenina y de la quercetina

	Naringenina	Quercetina
Fórmula química	C ₁₅ H ₁₂ O ₅ ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ ^a
Punto de fusión	251 °C ^a	316.5 °C ^a
Masa molecular (g /mol)	272.2	302.2
log P	2.47 ^a , 2.60 ^b , 2.52 ^c	1.81 ^a , 1.82 ^b , 1.48 ^c
log D (pH 6.5)	ND	1.00 ^c
pKa	7.95 ^c	8.25 ^c
Solubilidad acuosa	475 μg/ml (25 °C) ^c	60 μg/ml (16 °C) ^c
Porcentaje de formas no ionizadas a pH 6.5	96.62 ^c	98.26 ^c
Porcentaje de formas no ionizadas a pH 7.4	77.94 ^c	87.61 ^c
Nºgrupos aceptores puentes de hidrógeno	5	7
Nºgrupos donadores puentes de hidrógeno	3	7

a) Drug Bank b) Rothwell *et al.* 2005 c) Chabane *et al.* 2009

5.2. Farmacocinética de la naringenina y de la quercetina

Son muchos los estudios que se han llevado a cabo para tener un mejor conocimiento de la farmacocinética de la naringenina y la quercetina, tanto en humanos como en modelos animales después de la ingesta de frutas, zumos, salsas o extractos e incluso compuestos puros.

5.2.1. Naringenina

En estudios en humanos, la concentración plasmática máxima (C_{max}) de la naringenina se alcanza a las 4-7 h tras su ingesta dentro matriz alimentaria como es el zumo (Krogholm *et al.* 2010; Erlund *et al.* 2001), debido probablemente a una extensa absorción en la parte final del intestino. Cuando la naringenina es absorbida en forma de aglicona el t_{max} se consigue antes, a la hora o las dos horas desde el inicio de la ingesta (Kanaze *et al.* 2007; Bugianesi *et al.* 2004). Resultados similares fueron obtenidos en el estudio reciente de Martínez-Huelamo *et al.* 2015 en el que se estudió la influencia del aceite de oliva en la biodisponibilidad de la naringenina. En este caso se obtuvieron valores de C_{max} de 11.9 ± 2.7 nmol/L y un t_{max} de 18.8 ± 3.8 min para la salsa sin aceite con una concentración de naringenina de 3386.6 ± 122.3 ng/g peso fresco y C_{max} de 12.8 ± 3.1 nmol/L y un t_{max} de 45.0 ± 8.7 min para la salsa con un 5% de aceite con una concentración de naringenina de 3823.7 ± 216.7 ng/g peso fresco. En los estudios en los cuales la flavonona se administra en zumos o frutas el valor de C_{max} varía entre los 0.12 ± 0.03 μmol/L tras la ingesta de pequeñas cantidades de salsa de tomate (3.8 mg naringenina) hasta los 6.0 ± 5.4 μmol/L después del consumo de zumo de pomelo (8 mL/kg de zumo con 199 ± 42 mg de naringenina) (Bugianesi *et al.* 2002; Erlund *et al.* 2001).

La absorción de naringin, naringenin y naringenin glucurónido evaluada en perro Beagle tras la administración de cápsulas conteniendo 70 mg de flavonoides cítricos a partir de un extracto de pomelo dió lugar a valores de C_{max} de 0.24 μmol/L, 0.021y 0.09 μmol/L correspondientes a 80,

.. *Introducción*

20 y 30 minutos (medianas) para la naringin, naringenin y naringenin glucurónido, respectivamente (Mata-Bilbao *et al.* 2007).

La biodisponibilidad tras la ingesta de naringenina se estima en un 10% (Xu *et al.* 2009)

Respecto a la distribución de la naringenina, Breinholt *et al.* 2004 observaron que tras la administración de 17 dosis repetidas de naringin (sonda gástrica) a ratas (Wang *et al.* 2006). A las 6 h de la última dosis, no se halló naringina ni naringenina ni en plasma ni en ningún órgano estudiado; sin embargo si que se observó la presencia de metabolitos: naringenin glucurónido en plasma (3.7 nmol/L), en hígado (2.6 nmol/g) y en riñón (0.9 nmol/g), y naringenin sulfato en plasma (0.7 nmol/g), hígado (8.2 nmol/g), bazo (3.4 nmol/g), corazón (1.4 nmol/g) cerebro (1.1 nmol/g) y riñón (0.1 nmol/g). En ratón, tras una dosis oral de naringenina tritriada (4 mg/kg), a las 8 h post-administración la mayor radioactividad se localizó en el tracto gastrointestinal, seguida de los riñones y el hígado.

La eliminación de la naringenina se produce mayoritariamente por metabolismo, y sólo de un 3-7% se elimina inalterada en orina (Kanaze *et al.* 2007); la semivida biológica estimada tras la administración intravenosa (20 mg/kg) en ratas (Yáñez *et al.* 2008) es de 3-7 h, y en el hombre entre 1-2h (Erlund *et al.* 2001). La naringenina sufre un extenso metabolismo de primer paso intestinal y hepático dando lugar a metabolitos de fase II, mayoritariamente glucoconjugados en el hombre (Martínez-Huélamo *et al.* 2015) y sulfato conjugados en rata (Wang *et al.* 2006) y ratón (Orrego-Lagarón *et al.* 2015). Estos metabolitos son posteriormente excretados vía biliar y vía renal (mayoritaria). La excreción biliar de estos compuestos da lugar a una recirculación enterohepática que se pone en evidencia por la presencia de un segundo pico en la curva de concentración plasmática vs. tiempo (Tulipani *et al.* 2012; Yáñez *et al.* 2008; Ma *et al.* 2006).

5.2.1. *Quercetina*

La quercetina es un flavonol ampliamente estudiado. Son numerosos los estudios que informan acerca de las características farmacocinéticas de este compuesto, básicamente sus niveles plasmáticos y las cantidades y/o porcentajes excretados en orina. Una recopilación de algunos estudios se expone en la **tabla 1.8**. Sin embargo, existe poca información acerca de su biodisponibilidad oral que se estima entre 0.004-0.1% (como valor predicho) (Boonpawa *et al.* 2014), del 0.3% estimada en el cerdo (Ader *et al.* 2000) y del 5.3% en rata (Chen *et al.* 2005). Este valor parece aumentar con dietas ricas en grasas (Lesser *et al.* 2004; Vries *et al.* 1998).

En el primer estudio en humanos diseñado por Petri *et al.* 2003 se observó un porcentaje de absorción alto, de un $60 \pm 31\%$ y un P_{eff} de $8.9 \pm 7.1 \cdot 10^{-4}$ cm/s. El tiempo en el que se alcanza la C_{max} varía mucho en función de la forma en la que se administra. Erlund *et al.* 2000, observó como el t_{max} era menor al administrar quercetina como aglicona que como glucosido (rutina)

(1.9 h vs. 6.5 h, respectivamente para una dosis de 8 mg). Administrada como α G-rutina, un glucósido de la rutina, el t_{max} alcanza un valor de 30 min, un valor mucho menor a las 8 h que alcanzan la quercetina o la rutina (Shimoi *et al.* 2003). Chen *et al.* 2005, tras la administración oral de la quercetina (10 mg/kg) solubilizada en una solución al 15% de ciclodextrina observó un t_{max} de 0.083 h en rata. A través de la dieta y en un estudio en humanos, Goldberg *et al.* 2003, determinó un t_{max} de 0.5 h para una dosis de 10 mg/kg de quercetina disuelta en tres matrices alimentarias diferentes; vino blanco, zumo vegetal y mosto en un estudio con humanos.

Tras la administración de quercetina (10 mg/kg) en solución al 15 % (p/v) en hidroxipropil- β -ciclodextrina por vía oral e intravenosa a las ratas, se obtuvo la curva de niveles plasmáticos que se expone en la **figura 1.20**. De acuerdo con la figura, la diferencia en los valores del área bajo la curva se atribuye a un metabolismo de primer paso, mayoritariamente intestinal según los autores del estudio.

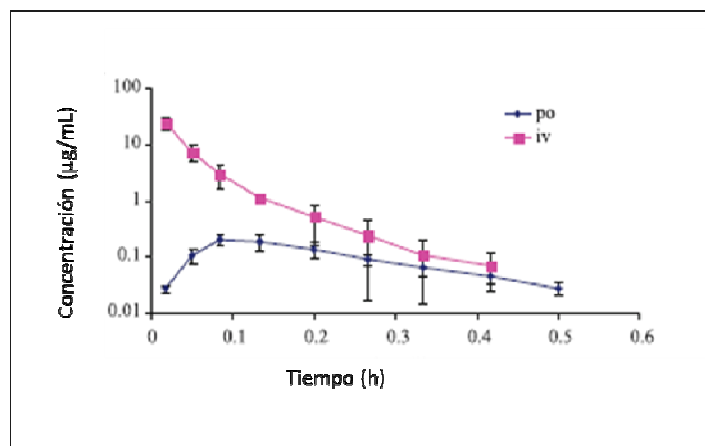


Figura 1.20. Concentración plasmática de quercetina tras la administración oral (po) e intravenosa (iv) a la dosis de 10 mg/kg en ratas (n=5) (tomado de Chen *et al.* 2005)

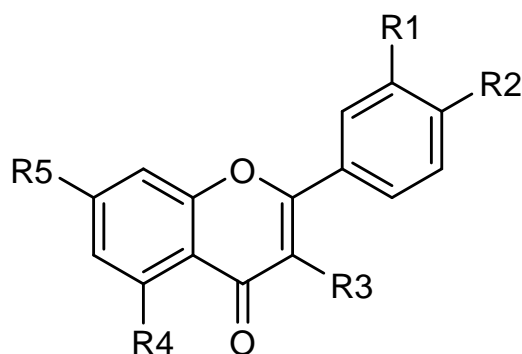
La quercetina se une mucho a la albúmina plasmática (> 98%) (Gugler, 1975; Lakhanpal y Rai, 2007). Su distribución en los distintos órganos y tejidos del organismo puede variar si el compuesto se administra en dosis únicas o repetidas, Bieger *et al.* 2008 en un estudio en cerdos tras la administración de una dosis única (25 mg/kg) observó los valores más altos de concentraciones de quercetina en hígado mientras que a dosis repetidas (50 mg/kg) durante 4 semanas éstas se obtuvieron en la pared intestinal y en los riñones. En otros tejidos (riñón, yeyuno, colon, hígado, pulmones, nódulos linfáticos, tejido adiposo, diafragma, músculo y cerebro) se encontraron cantidades variables de quercetin-glucurónido.

Otro estudio realizado por Graf *et al.* 2006 puso de manifiesto que tras la administración oral de quercetina (4.5 g/kg) durante 6 semanas a ratas, un 94-100% de quercetina fue hallada en el contenido intestinal, mientras que en el tejido gastrointestinal se encontraron alrededor de 11

.. *Introducción*

metabolitos (glucurónidos, sulfatos, metilados). En el hígado, riñones y plasma la quercetina estaba en la forma metil- quercetin monoglucuronizada sulfato (conjugados mixtos).

La eliminación de la quercetina se produce mayoritariamente por metabolismo, siendo sus principales metabolitos la isorhamnetin/tamarixetin (isómeros *O*-metilados) presentes en plasma mayoritariamente como gluco o sulfato conjugados (**figura 1.21**). No se excreta como aglicona a través de la bilis, pero sí en forma de sulfato, gluco y metil-conjugados, aunque la circulación entero-hepática es prácticamente inexistente (Chen *et al.* 2005). La aglicona se excreta en orina en un 0.5% a partir del consumo de zumo de manzana (Young *et al.* 1999) y té negro, y en 1.1% a partir de cebolla frita y sopa de cebolla (Shi y Williamson, 2015) debido a su mayor absorción a partir de estas matrices (Vries *et al.* 1998). En orina también se excretan metabolitos de la quercetina derivados de la acción de la microbiota como los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 3,4-dihidroxibenzoico y el 3-hidroxifenilacético.



	R1	R2	R3	R4	R5
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH
Isorhamnetin	OMe	OH	OH	OH	OH
Tamarixetin	OH	OMe	OH	OH	OH
Quercetin-3'-sulfato	SO ₃	OH	OH	OH	OH
Isorhamnetin-3-glucurónido	OMe	OH	GlcUA	OH	OH

*Con grupo metilo (OMe), sulfúrico (SO₃) y glucuronido (GlcUA).

Figura 1.21. Estructura molecular de la quercetina y sus metabolitos conjugados (Graf *et al.* 2006).

La semivida de eliminación tras la administración intravenosa en cerdos (0.4 mg/kg) es de 17.2 ± 3.7 h (Ader *et al.* 2000). En el hombre, tras la administración oral de suplementos de quercetina (100 mg) administrada como quercetina-4'-*O*-glucósido da lugar a una semivida aparente de eliminación de 11 h (Graefe *et al.* 2001). Tras la ingesta continuada de quercetina, ésta se acumula en plasma dando lugar a una semivida de unas 28 h (consumo de cebollas) o 23 h (té y manzanas).

Tabla 1.8. Estudios de quercetina: parámetros farmacocinéticos estimados y fuente bibliográfica

Referencia	Polifenol	Sujetos	Dosis	Tmax plasma (h)	Cmax	t1/2 (h)
Hollman <i>et al.</i> 1996	Quercetina	2	64 mg VO	2.9	65 ng/mL	16.8
Hollman <i>et al.</i> 1997	Quercetina	9	68 mg VO	0.7	74 ng/mL	28.0
Erlund <i>et al.</i> 2000	Quercetina	16	8 mg VO	1.9	41.4 ng/mL	17.1
	Quercetina	16	20 mg VO	2.7	66.1 ng /mL	17.7
	Quercetina	16	50mg VO	4.9	86.1 ng/mL	15.1
Graefe <i>et al.</i> 2001	Quercetina	12	100 mg VO	0.7	2120 ng/mL	11.9
	Quercetina	12	200 mg VO	4.32	640 ng/mL	10.3
Goldberg <i>et al.</i> 2003	Quercetina	12	10 mg VO	0.5	15-42 ng/mL	ND
Moon <i>et al.</i> 2008	Quercetina	10	500 mg VO	3	15.4 ng/mL	3.47
Krogholm <i>et al.</i> 2010	Quercetina	10	0.19 mg/kg VO	3.6	15 ng/mL	ND

ND = No determinado; VO = vía oral.

5.3. Actividad farmacológica y efectos bioactivos de la naringenina y la quercetina

Son muchos los estudios epidemiológicos que muestran una asociación entre el riesgo de padecer enfermedades crónicas degenerativas y el consumo de una dieta pobre en polifenoles (Willcox *et al.* 2008; Giovannucci, 2005; Erlund, 2004). Por ello, actualmente ha crecido el interés del estudio de los polifenoles, y en mayor medida de los flavonoides, principalmente en la prevención de enfermedades como cáncer, la enfermedad cardiovascular o la diabetes (Boots *et al.* 2008; Boocock *et al.* 2007). Estas enfermedades tienen un alto componente oxidante, por eso los polifenoles entre otras causas y debido a sus propiedades antioxidantes contribuyen a disminuir la incidencia de estas patologías.

5.3.1. Efecto antioxidante

Un compuesto antioxidante se define como cualquier sustancia que se presenta en concentración baja comparada con la del sustrato oxidable, capaz de retrasar o inhibir la oxidación de ese sustrato (Rice-Evans *et al.* 1996; Halliwell y Gutteridge, 1995; Sies, 1993). Es decir, son sustancias capaces de neutralizar radicales libres, protegiendo así a las células del daño oxidativo. Todos los polifenoles son agentes reductores, capaces de eliminar los radicales libres, también participan en la regeneración de otros antioxidantes como la vitamina E y protegen a las células del daño oxidativo.

Su potencial redox viene determinado por su estructura química. De esta manera, los polifenoles con dos grupos hidroxilos vecinos en un grupo aromático tienen mayor capacidad antioxidante que aquellos con solo un grupo hidroxilo en la molécula.

5.3.2. Antioxidantes y estrés oxidativo

Los procesos fisiológicos normales como la respiración o las reacciones metabólicas dan lugar a especies oxidantes reactivas o ROS (*reactives oxygen species*). Los ROS de mayor importancia fisiológica incluyen: oxígeno (O_2), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), ozono (O_3) y ácido hipocloroso ($HOCl$). Aquellos ROS que son radicales libres (moléculas reactivas que tienen uno o más electrones libres) actúan directamente en su lugar de formación, sin embargo los “no-radicales” como H_2O_2 , son capaces de atravesar las membranas biológicas propagando su reactividad, causando más daño al hospedador. Los radicales libres producen daño celular a nivel macromolecular, como por ejemplo en el ácido desoxirribonucleico (ADN), los lípidos o las proteínas (Boots *et al.*, 2008; Helmja *et al.* 2008).

El cuerpo humano posee un mecanismo de defensa antioxidante en contra de las especies reactivas para proteger sus células y órganos. Este sistema involucra compuestos antioxidantes endógenos y exógenos que interactúan para neutralizar radicales libres. Los antioxidantes

endógenos son muy importantes para mantener un sistema celular óptimo, y se dividen en enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y no-enzimáticos (GSH, ácido ascórbico y ácido úrico). Por otro lado, los antioxidantes exógenos, son aquellos que provienen del exterior, como los polifenoles, antioxidantes naturales provenientes de la dieta (Boots *et al.* 2008).

En situaciones normales, la red de antioxidantes endógenos son capaces de proteger al organismo de las ROS; sin embargo, frente a alta exposición al alcohol, a determinados medicamentos, traumas, catarros o infecciones, se produce un desajuste entre la producción de radicales y el mecanismo de defensa antioxidante a favor de las especies reactivas, pudiendo causar daños a nivel macromolecular. A esta situación se le llama estrés oxidativo. Las defensas no son suficientes para actuar ante este estrés oxidativo, y por ello los antioxidantes exógenos son imprescindibles para combatirlo (Boots *et al.* 2008).

Recientemente, muchos estudios se han centrado en el papel que tienen los flavonoides en relación con las ROS. Gracias a los grupos hidroxilo son capaces de eliminar radicales libres, protegiendo así a lípidos y ADN del daño oxidativo:



Relación disminución de radicales libres/naringenina

La peroxidación lipídica provoca cambios en las membranas biológicas (en los ácidos grasos insaturados) alterando la permeabilidad de la célula que desemboca en muchos casos en muerte celular. La naringenina ha demostrado capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y por tanto protege a las células de la muerte celular (Cavia-Saiz *et al.* 2010; Yu *et al.* 2005). En cuanto al ADN, los radicales libres causan un daño oxidativo en el ADN debido al cual, se produce una pérdida de expresión o síntesis de proteínas, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. Estos cambios del ADN pueden derivar en enfermedades tan graves como el cáncer. In vitro, la naringenina ha demostrado tener poder protector del ADN a partir de concentraciones iguales o mayores de 1 $\mu\text{mol/L}$ (Cavia-Saiz *et al.* 2010).

Relación disminución de radicales libres/quercetina

Debido a su potente actividad antioxidante, la quercetina puede prevenir el cáncer inducido por el estrés oxidativo (Bagherl *et al.* 2012). También se ha observado un efecto sinérgico en la respuesta farmacológica de la doxorubicina en cáncer de mama cuando ambos compuestos son

administrados intratumoralmente (Du *et al.* 2010), y un efecto inhibitor de la angiogénesis en cáncer de mama que ofrecía resistencia al tamoxifeno (Oh *et al.* 2010).

5.3.3. *Antioxidantes y enfermedad cardiovascular*

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte en Europa y en mundo en general, con mayor prevalencia en mujeres que en hombres. El estudio “*Global Burden of Disease*” estimó que en el año 2010, el 29.6% de las muertes en el mundo fueron causadas por una enfermedad cardíaca. En Europa mueren al año más de 4 millones de personas por enfermedad cardiovascular, y muchas son hospitalizadas tras padecer algún episodio cardiovascular agudo (Nichols *et al.* 2013).

Numerosos estudios han demostrado como el consumo de polifenoles disminuye la incidencia de padecer enfermedades cardiovasculares. Uno de los primeros estudios que reflejó esta asociación fue el WHO/MONICA (*The World Health Organization/Monitor Trends in Cardiovascular Diseases*) (Gey *et al.* 1991; Tressera-Rimbau *et al.* 2014; Medina-Remón *et al.* 2015; Guo *et al.* 2016). El efecto protector de los polifenoles se puede explicar por una disminución en los factores de riesgo, al ser por ejemplo, inhibidores potentes de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low density lipoproteins*), que es causante de la arterioesclerosis. Además son capaces de incrementar el óxido nítrico y disminuir la presión arterial provocando así un efecto antiplaquetario y antiinflamatorio.

Relación naringenina/arterioesclerosis

La naringenina tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de la dislipemia. Mulvihill *et al.* 2010, demostró que una dieta suplementada con naringenina mejoraba los niveles de colesterol, triglicéridos e hiperinsulinemia y reducía la esteatosis hepática en ratones, y que en conjunto, condujeron a una reducción del 70% de arterioesclerosis respecto a los animales alimentados con una dieta rica en grasas saturadas y colesterol. Esta suplementación de la dieta con naringenina también resultó en una disminución de los triglicéridos y del colesterol en un 50 y 70%, respectivamente, gracias a la reducción de las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) y el LDL. Además, también observó una disminución del diámetro de la placa de ateroma, debido a un menor depósito de macrófagos y células musculares lisas, así como del depósito de elastina y colágeno. Resultados similares obtuvieron Asini *et al.* 2013 y Jeon *et al.* 2007.

La naringenina también ha mostrado efectos antihipertensivos, otro factor de riesgo cardiovascular. Saponara *et al.* 2006, demostró como la naringenina activaba los canales de calcio dependiente de potasio que son importantes reguladores de la relajación vascular. Se

conocen más mecanismos de acción que evidencian la actividad hipotensora de la naringenina como los descritos por Chen *et al.* 2012 y Fallahi *et al.* 2012.

Relación quercetina/arterioesclerosis

La quercetina presenta efectos protectores frente a la enfermedad cardiovascular (Islam *et al.* 2014), a través de distintos mecanismos: por su actividad antiinflamatoria (Russo *et al.* 2012), actividad vasodilatadora (Larson *et al.* 2012), sobre la aterosclerosis, actividad antihipertensiva (Edwards 2007) y actividad frente a la dislipidemia (Lee *et al.* 2011, Pfeuffer *et al.* 2011). Los efectos se ponen de manifiesto tras la ingesta de quercetina durante períodos prolongados (8, 10, 12 semanas) y en pacientes, fumadores y/u obesos con síndrome metabólico, con riesgo cardiovascular.

5.3.4. Antioxidantes y diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por una hiperglicemia causada por una secreción insuficiente de insulina endógena, o bien debida a una insuficiente actividad de la misma que afectan al metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Esta hiperglicemia crónica da lugar a una autooxidación de la glucosa, a una glicosilación no enzimática de las proteínas, a una alteración del metabolismo del GSH, a alteraciones en los enzimas antioxidantes y a la formación de peróxidos lipídicos. Estos acontecimientos conllevan a la generación de radicales libres y a una disminución de la actividad antioxidante del organismo. Este aumento en las especies reactivas de oxígeno produce destrucción del páncreas y disfunción de las células pancreáticas beta (Annadurai *et al.* 2012).

Relación naringenina/diabetes

De acuerdo con el estudio de Mulvihill *et al.* 2009 en ratones obesos, se observó cómo la naringenina suplementada (1 y 3%) en la dieta mejoraba la sensibilidad de los animales a la insulina y la tolerancia a la glucosa, es decir, mejoraban los trastornos metabólicos asociados a la resistencia a la insulina. Otro estudio realizado por Annadurai *et al.* 2012 en ratas diabéticas puso de manifiesto efectos farmacológicos de la naringenina similares a los del antidiabético oral gliclazida. En este trabajo, se administró por vía oral naringenina (50 mg/kg) durante 21 días, y se observó un descenso en los niveles de glucosa en sangre y hemoglobina glicosilada, aumento en los niveles de insulina en sangre, mayores actividades de los enzimas pancreáticos antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, GST), mayores niveles de antioxidantes no enzimáticos en plasma (GSH, vitamina C y vitamina E) y menores niveles de pancreáticos de malondialdehído (MDA). Kapoor y Kakkar (2014) observaron un efecto protector de la naringenina frente al daño hepático ligado a la diabetes.

Relación quercetina/diabetes

Constantino *et al.* 1999, demostraron que la quercetina actuaba como inhibidora del enzima aldosa reductasa, responsable de la transformación de la glucosa en sorbitol. En pacientes diabéticos, los niveles de sorbitol están aumentados, y son responsables de los problemas secundarios asociados a la diabetes (neuropatías, retinopatías, cataratas y nefropatías).

6. Análisis e identificación de compuestos fenólicos y sus metabolitos

El análisis de los polifenoles es una tarea difícil debido a la amplia variedad de moléculas existentes. Una de las principales razones que dificulta su análisis es la poca disponibilidad comercial de muchos de los patrones. A lo largo del tiempo se han utilizado distintas técnicas separativas para el análisis y la identificación de estos compuestos en diferentes tipos de matrices, incluyendo la electroforesis capilar (CE, *capillary electrophoresis*) (Herrero-Martínez *et al.* 2005), la cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) (Friedman, 2004) y la resonancia magnética nuclear (RMN) entre otras; sin embargo, la tendencia actual es utilizar las técnicas cromatográficas, especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) acoplada a un espectrómetro de masas (Martínez-Huélamo *et al.* 2012; Vallverdú-Queralt *et al.* 2010) ó cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, *ultra-high-performance liquid chromatography*). A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado el HPLC-ESI-MS/MS (*HPLC-ESI-tandem mass spectrometry*) y el UHPLC-MS/MS (*ultra-high-performance liquid chromatography*) para la identificación y cuantificación de los compuestos en las muestras biológicas estudiadas debido a su gran sensibilidad. Además, y con el objetivo de obtener un perfil metabólico más exhaustivo de la naringenina, también se ha utilizado un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (MS) pero de alta resolución. El instrumento empleado fue un espectrómetro de masas híbrido de trampa de iones con transformada de Fourier (LC-LTQ-Orbitrap-MS, *liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry*) (Vallverdú-Queralt *et al.* 2010), que permite identificar compuestos respecto a su MSⁿ facilitando la obtención de información estructural.

6.1. Cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV)

La **cromatografía** es un método de separación física en el cual los componentes se distribuyen en dos fases inmiscibles: una fase móvil que fluye a lo largo de una fase estacionaria. En el caso de la **cromatografía líquida** la fase móvil es un líquido que recorre la fase estacionaria (un sólido o un líquido adherido a un sólido). Las dos fases se escogen de tal manera que los compuestos de la muestra se distribuyan de distinto modo entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven

lentamente por el flujo de la fase móvil, permitiendo a los compuestos separarse según esta movilidad en bandas y poder ser analizados cuali- o/y cuantitativamente (Skood *et al.* 1992). El **HPLC** es una clase de cromatografía líquida en la que la separación se produce entre una fase móvil (el solvente) y una fase estacionaria (la columna). Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria la separación se puede dar de 4 maneras diferentes:

1. Cromatografía de adsorción: se basa en la magnitud de la interacción de los distintos componentes de la muestra con la fase sólida (fenómeno de adsorción).
2. Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria es un sólido capaz de intercambiar iones con la fase móvil.
3. Cromatografía de afinidad: la separación se da por a una interacción específica entre el analito y la columna.
4. Cromatografía de exclusión molecular: la separación se produce por el tamaño molecular, de tal manera que la fase estacionaria está formada por un material lleno de poros con tamaños predeterminados.

La cromatografía de adsorción es la más utilizada. Se distinguen dos modelos según la polaridad de las fases utilizadas:

- a) Fase normal: la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. De este modo los compuestos polares son fuertemente retenidos por la columna, dejando a los compuestos no polares eluir primero.
- b) Fase reversa: la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. En este caso, los compuestos no polares son fuertemente retenidos por la columna, dejando a los compuestos polares eluir primero (mayor tiempo de retención para los compuestos apolares). Este tipo de fase es la más utilizada en la actualidad, ya que, la mayor parte de los compuestos de interés son de naturaleza hidrofílica. Normalmente, se usan como fase estacionaria hidrocarburos como C8 (n-octilo) o C18 (n-octadecilo).

La elución de los compuestos depende por tanto de la polaridad de la fase móvil, y ésta puede mantenerse constante a lo largo de todo el proceso cromatográfico (elución isocrática) o variar a lo largo del método (elución a gradiente) (Belanger *et al.* 1997).

En el caso de los compuestos fenólicos es frecuente utilizar cromatografía de adsorción en fase reversa a gradiente. La columna de separación que se utiliza mayoritariamente es una columna C-18 de silica gel, de una longitud entre 100 y 300 mm y con un diámetro interno de entre 2-4.6 mm, aunque ocasionalmente se pueden usar columnas C8. Se aconseja que la columna se mantenga a una temperatura de 40 °C durante el análisis. Mantener la temperatura constante durante el análisis es importante para obtener tiempos de retención reproducibles y una mejor resolución de los picos. Además permite reducir la presión de la columna a altas velocidades de flujo. La elección de un método a gradiente es esencial para la buena separación estructural de las diferentes moléculas. Normalmente se usa un solvente A (agua acidificada ó buffer acuoso)

.. Introducción

y un solvente B, que puede ser un solvente orgánico como metanol o acetonitrilo, puro o acidificado. El volumen de inyección puede variar desde 1 a 100 μL , dependiendo del diámetro interno de la columna (Lamuela-Raventós, 2014).

Instrumentación del HPLC:

La instrumentación básica para llevar a cabo un análisis mediante HPLC está esquematizada en la **figura 1.22**, y consta de: un sistema de suministro y almacenamiento de la fase móvil, un sistema de bombeo, un sistema de inyección de la muestra, una columna, un detector y un sistema de adquisición de datos.

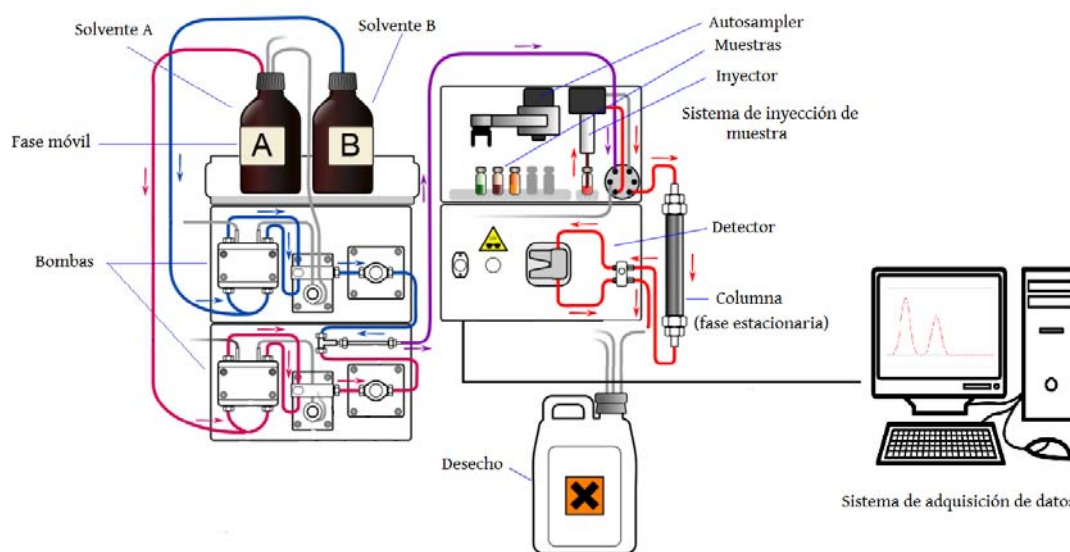


Figura 1.22. Esquema que incluye los componentes básicos de un HPLC

Los equipos más modernos de HPLC incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas (15000 psi) como el UHPLC. Estos equipos utilizan columnas de un tamaño de partícula menor ($1.7 \mu\text{m}$) que proporcionan una mayor resolución y una mayor eficiencia que las columnas convencionales. En general, el UHPLC mejora la sensibilidad y la resolución de los picos cromatográficos, reduciendo así el tiempo de análisis y los costes. Debido a estas mejoras al final de esta tesis se ha utilizado este equipo acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) para el análisis de las muestras. Otros autores como Ortega *et al.* 2010 ya han utilizado esta técnica para el estudio de compuestos naturales.

El ultravioleta es el detector de HPLC mas simple y comúnmente utilizado debido a su gran sensibilidad, linealidad, versatilidad y fiabilidad (Wolfender, 2009). Permite la determinación de un gran número de compuestos y grupos funcionales, y además es fácil de usar y tiene un coste relativamente bajo. Su fundamento consiste en la interacción entre la radiación UV-Vis y la

materia, dando origen a un fenómeno conocido como absorción de la radiación. Hay diferentes tipos de detectores UV: de longitud de onda fija y de longitud de onda variable (DAD, *diode array detector*).

Los compuestos fenólicos, debido a la existencia de dobles enlaces conjugados y compuestos aromáticos, exhiben absorbancia en la región UV-Vis, a diferente longitud de onda. Los flavonoides tienen dos bandas de absorción características: la primera entre 240 y 285 nm de longitud de onda, correspondiente al anillo A, y la segunda banda tienen su máximo en un rango de 300 nm a 550 nm, la cual se atribuye a la sustitución o conjugación del anillo C. Con respecto a los flavonoides, cada subclase presenta absorciones características, por ejemplo las flavonas y los flavonoles (quercetina) presentan bandas intensas a 280-350 nm y las flavononas (naringenina) a 280-290 nm (Abad-García *et al.* 2009; Sakakibara *et al.* 2003).

6.2. Cromatografía líquida de alta resolución con detección de espectrometría de masas (HPLC-MS)

Desde que se construyó en 1912 el primer espectrómetro de masas, este equipo no se ha dejado de desarrollar, pasando de analizar pequeñas moléculas inorgánicas a ser capaz de analizar prácticamente cualquier molécula (El-Aneed *et al.* 2009). Es la técnica más utilizada en el análisis de muestras biológicas, gracias a su sensibilidad, selectividad y al hecho de que es uno de los pocos sistemas que proporciona información estructural.

La MS se basa en la separación de iones en fase gaseosa de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Puede utilizarse directamente (experimentos de inyección directa), aunque su combinación con una técnica de separación, mejora la determinación de los compuestos, resultando muy útil en análisis de muestras complejas.

Los espectrómetros de masas constan de los elementos que se muestran en la **figura 1.23**: un sistema de introducción de la muestra (ej. HPLC), una fuente de ionización, un detector y un analizador.

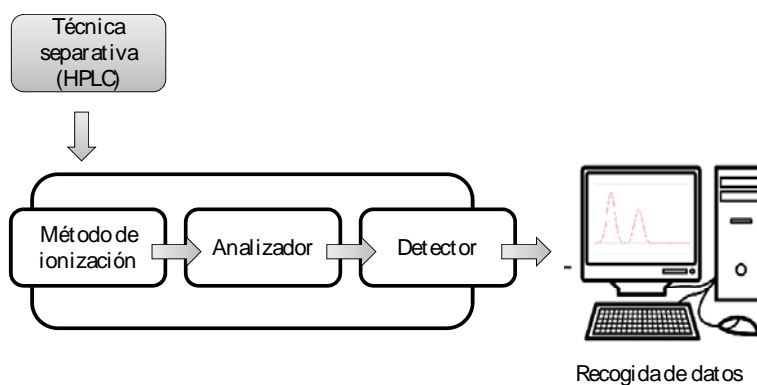


Figura 1.23. Esquema de un sistema MS.

Método de ionización: Para llevar a cabo el acoplamiento de la técnica separativa empleada (HPLC) que trabaja en fase líquida con el espectrómetro de masas, en el que las sustancias han de estar en fase gaseosa para ser analizadas, es necesaria la utilización de una interfase adecuada que transfiera los iones desde una fase a otra. La interfase, por lo tanto, es donde se producen las especies cargadas, es decir, se produce la ionización de los analitos de la muestra. En el presente trabajo se ha utilizado la interfase ESI (*electrospray ionization*), que además es la más utilizada.

Analizador de masas: Es donde se produce la discriminación de los iones de diferente m/z al ser sometidos a campos magnéticos y/o eléctricos constantes. Los más comunes en el análisis de polifenoles son: cuadrupolo simple (Q), triple cuadrupolo (QqQ), trampas de iones (IT), tiempo de vuelo (QTOF, *quadrupole time of flight*) y el más reciente, el LTQ-Orbitrap (Ronald Ross Watson, 2014; McLuckey y Wells, 2001). En esta tesis se utiliza el analizador “triple cuadrupolo” y el LTQ-Orbitrap.

Triple cuadrupolo (QqQ): Los cuadrupolos (Q) están formados por cuatro cilindros paralelos conectados, sobre los que se aplica un voltaje. Debido a esto se generan campos electromagnéticos, los cuales determinan que iones (según su m/z) lleguen al detector en un tiempo determinado. El triple cuadrupolo consiste en tres cuadrupolos conectados en serie. El cuadrupolo 1 (Q1) y el 3 (Q3) funcionan como analizadores y el 2 (Q2) es la celda de colisión (*CID, collision induced dissociation*). El estado de Q1 y Q3 cambia según en el experimento que se necesite. Si se busca un compuesto o una familia específica de compuestos se utilizan experimentos de *precursor ion scan* (Prec) o de *neutral loss* (NL), mientras que si lo que se quiere es confirmar la identidad de un compuesto determinado se llevan a cabo experimentos de *product ion scan* (PIS). El *multiple reaction monitoring* (MRM), se utiliza básicamente para obtener mejores límites de detección y para cuantificar los analitos. Este último es el utilizado durante la realización de esta tesis doctoral.

• **LTQ-Orbitrap:** Se ha empezado a utilizar como complemento al análisis de polifenoles en alimentos y muestras biológicas (Quifer-Rada *et al.* 2015; Vallverdú-Queralt *et al.* 2010). Permite el análisis de MS y MSⁿ, facilitando la obtención de la información estructural específica de las masas con un error inferior a 2 ppm. Es una buena herramienta para el análisis cualitativo y facilita la identificación estructural de compuestos desconocidos.

Hipótesis y Objetivos



II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

- ✓ Los bajos porcentajes de biodisponibilidad oral de la naringenina (10%) y la quercetina (0.004-0.1%) obtenidos por Xu et al. 2009 y Boonpawa et al. 2014, respectivamente, hacen patente la dificultad que tienen ambos flavonoides para acceder intactos al torrente sanguíneo. Encontrar los factores responsables de esta baja disponibilidad permitiría utilizar estrategias para incrementarla.
- ✓ Uno de los factores que más influencia tienen sobre la biodisponibilidad oral de los compuestos es la permeabilidad/absorción a nivel gastrointestinal.
- ✓ El metabolismo intestinal, hepático y/o el producido por los enzimas de la microbiota pueden también influir en la biodisponibilidad de la naringenina y la quercetina.
- ✓ Ciertos metabolitos producidos tras su ingesta podrían ser los responsables de parte del efecto fisiológico otorgado a la naringenina, dada la baja biodisponibilidad de la naringenina respecto a su alto efecto biológico.
- ✓ Tras su administración oral, la naringenina recorre todo el tracto gastrointestinal, pudiendo ser absorbida a distintos niveles. También a nivel gástrico es importante estudiar su absorción y metabolismo.
- ✓ Respecto al metabolismo en el colon existe información acerca del metabolismo producido por las enzimas microbianas, pero pocos estudios se centran en el metabolismo a nivel citosólico. Su estudio permitiría profundizar en el perfil metabólico de la naringenina.
- ✓ La microbiota modifica la biodisponibilidad de la naringenina, una disminución de la microbiota por el uso de antibióticos, tales como la Rifaximina provocaría cambios tanto a nivel metabólico como en su permeabilidad.
- ✓ El HPLC-ESI-MS/MS (*high-performance-liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*) es la técnica más utilizada para el análisis de polifenoles proporcionando la identificación y cuantificación de las agliconas y sus metabolitos, sin embargo, su baja sensibilidad da lugar a límites de detección altos, que impiden el análisis de compuestos a concentraciones bajas. La combinación con otra técnica analítica de mayor sensibilidad (LC-ESI-LTQ-Orbitrap) podría permitir la identificación de más metabolitos.
- ✓ Se prevé elevada absorción intestinal de la naringenina y la quercetina, de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, se podría producir una interacción a nivel del metabolismo dado que ambos compuestos sufren un elevado metabolismo de fase II. Dicha interacción podría traducirse en un aumento en la biodisponibilidad de alguno de los dos polifenoles.

2. Objetivos

1. Estudiar la absorción intestinal de la naringenina mediante el modelo de perfusión intestinal de un solo paso en ratón en los distintos tramos del tracto gastrointestinal; estómago, intestino delgado y colon.
2. Desarrollar una **dieta exenta de polifenoles**, apta para el consumo diario de los ratones en los días previos al estudio de absorción y que aporte los nutrientes y vitaminas necesarios para un correcto crecimiento de los animales.
3. Estudiar de la **estabilidad** de la naringenina a los distintos pHs (2; 6.2 y 7.2) y de la quercetina a pH 6.2 a 37°C durante 3 h.
4. Evaluar la **solubilidad** de la naringenina y la quercetina a distintos pHs.
5. Evaluar el **metabolismo** intestinal de la naringenina en todos los niveles intestinales.
6. Estudiar la **influencia de la microbiota** en la permeabilidad de la naringenina en colon y ver cómo influye en su perfil metabólico.
7. Evaluar el efecto de efecto de primer paso intestinal y hepático de la naringenina, mediante la detección y cuantificación de los metabolitos en el lumen, bilis y plasma, utilizando un **HPLC-ESI-MS/MS**.
8. Proporcionar nuevos datos sobre el metabolismo que sufre la naringenina en las zonas menos estudiadas como son estómago y colon, gracias al uso combinado de dos técnicas cromatográficas el HPLC-ESI-MS/MS y el LC-ESI-LTQ-Orbitrap.
9. Determinar cómo se ve afectada la permeabilidad de la en **administración conjunta** con quercetina, así como, cómo se ve afectado su metabolismo.
10. Determinar la permeabilidad intestinal de la quercetina mediante el modelo de perfusión intestinal de un solo paso en ratón, para posteriormente compararlo con los resultados obtenidos del ensayo de coadministración de naringenina y quercetina.



III. RESULTADOS

Publicación 1.

Orrego-Lagarón, Naiara, Martínez-Huélamo, Miriam, Vallverdú-Queralt, Anna, Lamuela-Raventos, Rosa María & Escribano-Ferrer, Elvira. *High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism*. Br. J. Nutr. **114**, 169–180 (2015).

Resumen: La naringenina es el flavonoide predominante del tomate y al igual que otros flavonoides posee actividad antioxidante, anticancerígena e incluso, la capacidad de disminuir los niveles sanguíneos de lípidos y colesterol tras su administración oral (Xu *et al.* 2009). Para llegar a ejercer estos efectos beneficiosos, la naringenina debe de ser capaz de llegar a sangre y a sus lugares de acción en concentración suficiente, es decir, tener una biodisponibilidad adecuada. Sin embargo, datos bibliográficos informan que su biodisponibilidad es baja, del orden de 10% (Xu *et al.* 2009). Este hecho plantea ciertas cuestiones; la primera está relacionada con los factores que podrían ser los responsables de su baja biodisponibilidad: por un lado la permeabilidad intestinal de la naringenina y por otro, su metabolismo intestinal, hepático y el producido por los enzimas microbianos. Un estudio en profundidad de dichos factores reflejaría en qué grado se ve afectada la biodisponibilidad por cada uno de ellos, y aportaría información sobre cuáles son los factores dónde se puede actuar para incrementar la biodisponibilidad de la naringenina. Por otra parte, dado que los efectos beneficiosos sobre la salud persisten a pesar de la baja biodisponibilidad cabe pensar, que también los metabolitos derivados puedan contribuir en este efecto beneficioso. Por ello el estudio en profundidad de su metabolismo, otorgaría también información relevante sobre cuáles podrían ser los metabolitos responsables del efecto biológico de la ingesta de naringenina.

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, el primer objetivo de este estudio fue determinar la permeabilidad de la naringenina en estómago, intestino delgado y colon, con el fin de averiguar si su baja biodisponibilidad se debe a una baja permeabilidad del compuesto. El segundo objetivo es evaluar el metabolismo intestinal, hepático y de la microbiota intestinal en todas las zonas del tracto gastrointestinal, como una estimación de la eliminación pre-sistémica de la naringenina tras su administración oral. Por último y dado que un elevado número de metabolitos de los polifenoles hallados en estudios previos proceden de la acción de la microbiota sobre los mismos, se pretende estudiar la influencia de la flora bacteriana en el metabolismo de la naringenina.

Previo a la realización de los estudios de absorción y metabolismo, se llevó a cabo un estudio de solubilidad de la naringenina a los diferentes pHs del tracto gastrointestinal (pH 2, 5.5, 6.2 y

.. Resultados

7.2) dado que también la solubilidad es un factor que puede afectar a la biodisponibilidad de los compuestos administrados por vía oral (Amidon *et al.* 1995). También se realizó un estudio de estabilidad de la naringenina a la concentración de ensayo a 37 °C y en los medios de perfusión (pH 2, 6.2 y 7.2).

Para la realización de dichos ensayos se utilizó una técnica de perfusión intestinal *in situ* en ratón aplicada a los tres tramos gastrointestinales (estómago, intestino delgado y colon). A nivel colónico, se realizó también un estudio con animales a los que previamente se les eliminó parcialmente la microbiota mediante un tratamiento antibiótico con Rifaximina (50mg/kg, 5 días). En todos los ensayos se tomaron muestras de la solución de perfusión cada 10 min y de sangre y bilis al finalizar el ensayo (60 min). Las muestras se analizaron por HPLC-ESI-MS/MS, previa extracción de los polifenoles en las muestras de plasma y bilis, para evaluar la presencia de naringenina y de sus metabolitos.

Los resultados obtenidos indican una buena absorción de la naringenina a lo largo de todo el tracto gastrointestinal siendo en el intestino delgado donde se observa un P_{eff} más elevado ($7.80 \pm 1.54 \cdot 10^{-4}$ cm/s), similar al del naproxeno ($6.39 \pm 1.23 \cdot 10^{-4}$ cm/s) (fármaco de elevada permeabilidad según BCS), seguido del colon y estómago, por lo que se puede concluir que la permeabilidad no es el factor limitante de su baja biodisponibilidad. Por otro lado, la mayor cantidad de metabolitos en las muestras de lumen intestinal respecto a los de plasma y bilis, confirman un mayor metabolismo de primer paso intestinal para la naringenina respecto al hepático. El metabolismo en fase II fue el mayoritario siendo los metabolitos sulfo-conjugados (84.00 ± 12.14 %) los más abundantes seguidos de los glucoconjugados (8.40 ± 5.67 %), y se hallaron a los 5 min del inicio del ensayo. En colon además, se observó un alto metabolismo por parte de la microbiota. Respecto al estudio del efecto de la microbiota, se observó como el tratamiento con Rifaximina disminuía la permeabilidad de la naringenina y las cantidades de ácido 4-hidroxihipúrico y del ácido hipúrico en el lumen.

Cabe destacar que el estudio se ha realizado a una dosis de naringenina habitual en la dieta, y que es el primer estudio que engloba todas las zonas del tracto gastrointestinal, y que aporta nuevos datos sobre su metabolismo y en especial sobre el efecto de la microbiota. Estos resultados metabólicos podrían utilizarse como una herramienta fundamental en futuros estudios fármaco-dinámicos que estudien la posible relación entre los efectos de los metabolitos de la naringenina con concentración plasmática y/o en la biofase.

High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism

Naiara Orrego-Lagarón¹, Miriam Martínez-Huélamo^{2,3}, Anna Vallverdú-Queralt^{2,3}, Rosa M. Lamuela-Raventós^{2,3} and Elvira Escribano-Ferrer^{1,3*}

¹Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

²Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

³CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, E-28029 Madrid, Spain

(Submitted 23 May 2014 – Final revision received 9 April 2015 – Accepted 14 April 2015 – First published online 17 June 2015)

Abstract

The present study aims to determine the permeability of naringenin in the stomach, small intestine and colon, to evaluate intestinal and hepatic first-pass metabolism, and to study the influence of the microbiota on the absorption and disposition of naringenin (3.5 µg/ml). A single-pass intestinal perfusion model in mice (n 4–6) was used. Perfusate (every 10 min), blood (at 60 min) and bile samples were taken and analysed to evaluate the presence of naringenin and its metabolites by an HPLC-MS/MS method. To study the influence of the microbiota on the bioavailability of naringenin, a group of animals received the antibiotic rifaximin (50 mg/kg per d) for 5 d, and naringenin permeability was determined in the colon. Naringenin was absorbed well throughout the gastrointestinal tract but mainly in the small intestine and colon (mean permeability coefficient 7.80 (SD 1.54) $\times 10^{-4}$ cm/s and 5.49 (SD 1.86) $\times 10^{-4}$ cm/s, respectively), at a level similar to the highly permeable compound, naproxen (6.39 (SD 1.23) $\times 10^{-4}$ cm/s). According to the high amounts of metabolites found in the perfusate compared to the bile and plasma, naringenin underwent extensive intestinal first-pass metabolism, and the main metabolites excreted were sulfates (84.00 (SD 12.14)%), followed by glucuronides (8.40 (SD 5.67)%). Phase II metabolites were found in all perfusates from 5 min of sampling. Mice treated with rifaximin showed a decrease in naringenin permeability and in the amounts of 4-hydroxyhippuric acid and hippuric acid in the lumen. Naringenin was well absorbed throughout the gastrointestinal tract and its poor bioavailability was due mainly to high intestinal metabolism.

Key words: Naringenin: Metabolism: *In situ* single-pass perfusion: Gastrointestinal tract: Rifaximin

Naringenin is the predominant flavanone found in citrus fruit and tomato, and an important compound in the human diet. Like other flavanones, it shows antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activity, and the capacity to diminish blood lipids and cholesterol after oral administration⁽¹⁾. An inhibitory effect of naringenin on the hepatitis C virus has also been reported⁽²⁾. A growing awareness of these properties, together with its great abundance in our diet, has stimulated interest in naringenin. The benefits for human health attributed to polyphenols in general and to naringenin in particular depend on their oral bioavailability^(3,4). However, the oral bioavailability of naringenin is very low, being less than 10%⁽¹⁾. One of the major factors influencing bioavailability is the absorption/permeability of the compound through the gastrointestinal tract. If ingested in a solid state, its solubility

in physiological fluids could be a limiting factor for the rate and extent of absorption⁽⁵⁾. Moreover, two products with the same intestinal permeability could present differences in absorption due to variable dissolution *in vivo*. In this respect, ethanol at high concentration (>30% v/v) was shown to enhance the absorption of quercetin in rats⁽⁶⁾. Consequently, bioavailability essentially depends not only on the permeability of the compound through the gastrointestinal tract, but also on the elimination process by excretion and/or intestinal and hepatic metabolism, as well as the effect of microbial enzymes on these processes. An in-depth study of these processes could help to determine whether the benefits of naringenin for human health can be attributed to bioavailable naringenin or to its derived metabolites.

Abbreviations: NAR-GLU, naringenin glucuronide; NAR-SULF, naringenin sulfate; Peff, effective permeability coefficient.

* **Corresponding author:** E. Escribano-Ferrer, +34 9340 24578, email eescribano@ub.edu

Flavonoids participate in both enteric and enterohepatic recycling: the former is enabled by enteric excretion of phase II conjugates, whereas the latter involves the hepatic excretion of the conjugates into the bile. Both recycling processes require efflux transporters such as multidrug resistance-associated protein 2 (MRP-2)⁽¹⁾ and bacterial enzymes that can hydrolyse the conjugates to regenerate the aglycons, which are then reabsorbed and recycled into the systemic circulation. In this context, the study of the influence of the microbiota on the disposition of naringenin is of great interest. Chabane *et al.*⁽⁴⁾ elucidated the intestinal transport mechanism of naringenin and quercetin by means of an *in vitro* study (Caco-2 cells), but there is little information on the effect of intestinal metabolism on naringenin bioavailability. An attempt to shed light on this was made by Xu *et al.*⁽¹⁾, whose study in rats was centred on the glucuronidation pathway, providing no information about sulfates. Moreover, according to Jeong *et al.*⁽⁷⁾, mice are more suitable animals for studying the disposition of naringenin, since the amounts of flavonoid sulfates (especially at lower concentrations) excreted by rats are insignificant, while in mice they are of the same order as in human plasma and urine. Thus, the mouse intestinal perfusion model for compounds excreted as sulfates and glucuronides, including flavonoids, has significant advantages over the rat model. Moreover, Escribano *et al.*⁽⁸⁾ found a good correlation ($R\ 0.9631$) between the mouse permeability coefficient of five model drugs in mice and the fraction of oral dose absorbed in human subjects, showing the capacity of this model to predict human absorption.

Based on these considerations, and given that naringenin is a dietary compound that can be ingested from different sources and/or matrices (e.g. juice, tomato sauce and high-fat diet), allowing absorption to start in the stomach and continue throughout the intestinal tract, the aims of the present study were: (1) to determine the solubility of naringenin under physiological pH conditions and its effective permeability coefficient (Peff) through the gastrointestinal tract, using an *in situ* single-pass perfusion technique in mice. As a model drug, and according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS)⁽⁵⁾, naproxen was assayed as a high-permeability reference compound; (2) to evaluate the intestinal and hepatic first-pass effect through the detection and quantification of metabolites in the lumen, bile and plasma; (3) to study the influence of antibiotic treatment on the colonic permeability of naringenin and intestinal metabolism.

Materials and methods

Reagents and materials

Naringenin, naproxen, phloroglucinol, 3-phenylpropionic acid, (4-hydroxyphenyl) acetic acid, hippuric acid, quinic acid, rifaximin, phenol red, casein from bovine milk, L-cystine hydrochloride monohydrate, D,L-methionine, choline chloride and dextrin from maize starch were provided by Sigma-Aldrich; naringenin-4-O-glucuronide (NAR-GLU) and naringenin-7-O-glucuronide (NAR-GLU) were from Cayman Chemical Company; 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid was

from Extrasynthese; Hegsted salt mixture and Vitamin Diet Fortification Mixture were purchased from Group Taper; span 20 (Sorbitan monolaurate) and sodium carboxymethylcellulose from Fagron; and refined maize oil, saccharine and saccharose were purchased from a supermarket. Reagents, ZnCl₂, NaCl, sodium monohydrogen phosphate dehydrate, anhydrous disodium hydrogen phosphate, orthophosphoric acid and NaOH for analysis were provided by Panreac Química; and ethanol, methanol, acetonitrile and formic acid were purchased from Scharlau Chemie, S.A.

Animals and diet

Male CD1 mice (Harlan Interfauna Ibérica) weighing 30–35 g were used in the study. Mice were fed with a polyphenol-free diet for 7 d before the experiment to assure that the metabolites found in biological samples corresponded to the absorbed naringenin. The diet, based on Lieber *et al.*⁽⁹⁾, was isoenergetic with a multi-nutrient composition. It had the same fat content as the average 'normal' US diet, an amount recommended as 'healthy' by the Institute of Medicine, and provided sufficient vitamins and salts to prevent deficiencies in mice. The formulation contained sodium carboxymethylcellulose, which gives a semi-solid consistency that facilitates the homogeneous distribution of the components. The drinking-water was supplemented with ZnCl₂ (16.3 mg/l) to ensure healthy levels of this salt. Mice were housed in groups of six in cages located in temperature-controlled rooms (22°C), with a dark period from 20:00 to 08:00 hours, and free access to food and water. Body weight was recorded on a daily basis. Their diet (700 g) was prepared twice a week.

The diet was analysed by HPLC-MS/MS to confirm the lack of naringenin and its metabolites. Extraction of the polyphenol compounds from the diet was performed in triplicate following the procedure described by Vallverdú-Queralt *et al.*⁽¹⁰⁾ with some modifications. Samples of 0.3 g were homogenised by adding 3 ml of 80% (v/v) ethanol in Milli-Q water acidified with 0.1% (v/v) formic acid; after sonication for 5 min and centrifugation (1484.7 g at 4°C) for 20 min (Centrifuge 5415R), the supernatant was transferred into a flask and the extraction was repeated once following the same parameters. Both supernatants were combined and evaporated under N₂ flow and, finally, the residue was reconstituted with Milli-Q water (0.1% formic acid) up to 1.2 ml, and filtered using PTFE 0.44–45 µm filters (Waters).

Analytical methods

HPLC-ESI-MS/MS analysis. All perfusion, plasma and bile samples were analysed by high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). The liquid chromatograph was an Agilent series 1100 (Agilent) equipped with a thermostated autosampler and a column oven set to 30°C. This was coupled to an API 3000 triple-quadrupole mass spectrometer (PE Sciex) with a turbo ion spray source, which was used to identify and quantify the corresponding phenolic metabolites. Separation was achieved using a Luna C18 column (50 × 2.0 mm; 5 µm)

from Phenomenex using the following parameters: the mobile phase was H₂O (A) and acetonitrile (B), with 0.1% formic acid in both solvents. An increasing linear gradient (v/v) of B was used (*t* (min), %B), as follows: (0, 5); (2, 25); (10, 90); (11, 100); (12, 100); (17,5); (20,5), at a constant flow rate of 0.6 ml/min, and the injection volume was 20 µl. The turbo ion spray source was in negative mode with the following settings: capillary voltage, -4500 V; nebuliser gas (N₂), 10 (arbitrary units); curtain gas (N₂), 12 (arbitrary units); and drying gas (N₂) heated to 400°C. The declustering potential, focusing potential, collision energy and entrance potential (Table 1) were optimised to detect phenolic compounds with the highest signals, following the method described by Martínez-Huélamo and colleagues⁽¹¹⁾. The system was controlled by Analyst version 1.4.2 software supplied by Applied Biosystems.

Naringenin and the metabolites identified in the samples, together with their retention time, limit of detection and limit of quantification, are shown in Table 1.

The calibration curves for stability and perfusion samples were prepared in phosphate buffer (PBS) pH 2, 6.2 and/or 7.2, as appropriate for each experiment, and were linear over the concentration ranges 0.003–4 µg/ml (*r* > 0.998) for naringenin and its metabolites by HPLC-ESI-MS/MS. For the plasma and bile samples, the standards were prepared in water containing 0.1% (v/v) formic acid, as explained later. Metabolites were quantified by taking into account the limit of quantification. No commercial standards were available for 4-hydroxyhippuric acid and naringenin sulfate (NAR-SULF), so standards of similar structures were used for quantification: hippuric acid and unconjugated naringenin, respectively.

Isotonic phosphate buffers at pH 2, 6.2 and 7.2

The perfusion solutions (PBS) consisted of 9.2 g/l NaCl, 0.036 g/l NaH₂PO₄·2H₂O and 0.058 g/l Na₂HPO₄. The buffer pH was adjusted to pH 2, 6.2 and/or 7.2 by adding orthophosphoric acid or NaOH. The PBS contained 3.5 µg/ml of naringenin and 0.1 mg/ml of phenol red⁽¹²⁾. The concentration of naringenin was chosen taking into account its concentration in raw tomato (5 mg/kg approximately) and the daily ingestion of tomatoes in a Mediterranean diet (0.5 kg in raw tomato, tomato juice and tomato sauce) for a 70-kg person. The dose was then downscaled for a mouse (30 g). However,

the estimated concentration was then increased to 3.5 µg/ml, taking into account a potential decrease in concentration due to absorption and to be above the limit of quantification of the analytical method. The osmolality of the perfusion solutions was measured (Advanced[®] Model 3320 micro-osmometer; Advanced Instruments, Inc.).

Stability and solubility studies

The stability of naringenin in the PBS (pH 2, 6.2 and 7.2) was tested at 37°C. Six aliquots of the solutions were incubated at 37°C, and samples were taken at 0, 1, 2 and 3 h and stored at -20°C until analysis.

The pH-solubility profile of naringenin was determined at 37 ± 1°C in aqueous media at pH values of 1, 2, 5.5, 6.2 and 7.2. An excess of solid product was placed in a 2.5-ml amber vial, 2 ml of medium was added, and the system was shaken at 37°C for 24 h. After confirming the presence of undissolved material, an aliquot was removed and filtered (0.45 µm) in a 37°C tempered vial. Then, 500 µl of the filtered solution was transferred to a new vial containing 50 µl of ethanol. Finally, the concentration of naringenin in each sample was measured by HPLC. Three replicate determinations of solubility were carried out at each pH.

Perfusion experiments

The studies were conducted following a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain (trial no. CEEA 219/12).

Animals were monitored daily for body mass over a week to check that the diet was supplying enough nutrients and energy to maintain the growth curve⁽¹³⁾.

Single-pass intestinal perfusion was performed in mice according to the method described by Escribano *et al.*⁽⁸⁾, adapted for the stomach and colon. Six animals were used per biological segment (stomach, small intestine and colon), and in the case of the colon a separate group was also treated via gastric gavage with rifaximin (50 mg/kg per d for 5 d)⁽¹⁴⁾. Rifaximin is a non-systemic antibiotic with a broad spectrum of antibacterial action used to reduce intestinal microbiota⁽¹⁵⁾. In addition, in order to investigate whether naringenin is a flavonoid with high intestinal permeability, a further batch of animals was included in the study in which a solution of

Table 1. HPLC-MS/MS settings for the phenolic compounds

Compound	RT (min)	MS/MS	DP (V)	FP (V)	CE (V)	EP (V)	LOD (µ/ml)	LOQ (µ/ml)
Naringenin*	5.22	271 → 151	-50	-190	-30	-11	2.99 × 10 ⁻⁴	9.99 × 10 ⁻⁴
NAR-GLU*	4.20	447 → 271	-50	-190	-30	-11	2.51 × 10 ⁻⁴	8.37 × 10 ⁻⁴
NAR-SULF	7.14	351 → 271	-50	-190	-30	-11	-	-
3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid*	2.97	165 → 121	-30	-200	-20	-10	0.0338	0.1128
4-Hydroxyhippuric acid	1.45	194 → 100	-40	-200	-20	-10	-	-
3-Phenylpropionic acid*	4.78	149 → 105	-30	-200	-20	-10	0.4400	14.900
Hippuric acid*	2.66	178 → 134	-40	-170	-20	-10	0.0014	0.0049
(4-Hydroxyphenyl) acetic acid*	3.03	151 → 107	-40	-200	-20	-10	0.0045	0.0151

RT, retention time; DP, declustering potential; FP, focusing potential; CE, collision energy; EP, entrance potential; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; NAR-GLU, naringenin glucuronide; NAR-SULF, naringenin sulfate.

* Identified with standard.

naproxen (2.15 µg/ml), as a model of a highly permeable compound, was also assayed in the small intestine.

Mice, fed with a polyphenol-free diet for 1 week, were fasted overnight with free access to water the day before the perfusion experiment. Anaesthesia was induced by a 100 mg/kg intraperitoneal injection of ketamine (Imalgene 1000; Merial Laboratories S.A.) and 10 mg/kg of xylazine (Rompun[®] 2%, Bayer S.L.). Mice were placed on a homeothermic blanket to maintain their body temperature at 37°C. The abdomen was opened by a midline longitudinal incision, and the biliary duct was tied to avoid enterohepatic recycling. Then, the stomach (from the fundus to the pylorus), small intestine (starting from the duodenum, approximately 10–15 cm length) or the colon (approximately 2 cm length) were isolated. Two glass cannula (outer diameter 3 mm, inner diameter 2 mm; Duran[®], Vidrafoc) were inserted at the proximal and distal ends of the segment. The segment was gently rinsed with PBS pH 2, 6.2 or 7.2 (respectively) to remove the contents until the outlet solution appeared clear. Amber latex tubing (inner diameter 3 mm) was then connected to the inlet cannula, and a perfusion pump (Minipuls3, M312 model; Gilson, Inc.) was placed between the perfusate reservoir and the inlet cannula. Saline was dripped onto the surgical area, which was then covered with gauze to avoid dehydration. The experiment started by delivering the perfusion solution containing naringenin and phenol red at a flow rate of 0.20 ml/min (0.16 ml/min for the stomach) to the tubes and intestinal segment. The outflow perfusate was collected in 1.5-ml amber eppendorfs at 10-min intervals for 60 min. The first sample was taken 5 min after the start of continuous outlet flow from the intestine and through the distal cannula. Samples were centrifuged (7516.3 g for 10 min at 4°C) (Centrifuge 5415R) and 650 µl aliquots of the supernatant were spiked with 50 µl of ethanol to avoid precipitation of naringenin at lower temperatures and were then stored frozen (–80°C) until analysis. At 60 min, a blood sample was obtained via cardiac puncture, the gallbladder was collected and the length of the intestinal segment was measured. Bile samples from four to six mice were pooled and stored with all samples at –80°C until analysis by HPLC-MS/MS.

Solid-phase extraction of polyphenols from plasma and bile samples

On the day of analysis by HPLC-ESI-MS/MS, plasma and bile samples were defrosted and centrifuged (7516.3 g for 10 min at 4°C). An exact volume of supernatants was transferred into an amber eppendorf and diluted to 1 ml with water containing 0.1% (v/v) formic acid. An Oasis[®] HLB 30-µm (30 mg) 96-well plate (Waters) was activated by consecutively adding 1 ml of methanol and 1 ml of 1.5 M formic acid in water. The samples were loaded onto the plate, and cleaned up by adding 1 ml of 1.5 M formic acid, followed by 1 ml methanol: water ratio (5:95). Phenolic metabolites were then eluted with 1 ml of methanol acidified with 0.1% formic acid (v/v). The eluted fraction was evaporated to dryness (Techne) at room temperature under a stream of N₂, and reconstituted with 100 µl of water containing 0.1% (v/v) formic acid⁽¹⁶⁾.

All procedures were performed in a darkened room with a red safety light to avoid oxidation of the analytes.

Data analysis

Peff were calculated from the steady-state concentrations of naringenin in the collected perfusate, according to equation 1⁽¹⁷⁾ after correcting the outlet concentration according to the phenol red method^(18,19) (equation 2).

$$\text{Peff} = \frac{-\phi_{\text{in}} \ln \frac{C_{\text{in}}}{C_{\text{out.cor}}}}{2\pi RL} \quad (1)$$

where ϕ_{in} is the flow rate (0.20 and 0.16 ml/min for the stomach), C_{in} and $C_{\text{out.cor}}$ are the respective inlet and corrected outlet steady-state concentrations (equation 2), R is the radius of the mouse gastrointestinal segment (0.1 cm for small intestine^(20,21), 0.14 cm for colon⁽²²⁾); and in the case of the stomach, R was calculated assuming it to have the shape of a cylinder with a volume of 0.4 ml⁽²³⁾, and according to equation 3, L is the length of gastrointestinal segment after completion of the perfusion experiment.

$$C_{\text{out.cor}} = C_{\text{out}} \times \frac{\text{CPR}_{\text{in}}}{\text{CPR}_{\text{out}}} \quad (2)$$

where C_{out} is the concentration of naringenin in the perfusate at the specified time interval, CPR_{in} is the phenol red concentration in the inlet buffer solution and CPR_{out} is the phenol red concentration at the specific time interval.

$$R = \sqrt{\frac{0.4}{\pi L}} \quad (3)$$

The Peff was determined in four to five mice at between four and six steady-state outlet concentrations, and expressed as means and standard deviations.

The percentage absorption (% abs) was calculated according to equation 4⁽²⁴⁾ and the results were expressed as means and standard deviations.

$$\% \text{ abs} = \left[1 - e^{-\frac{2\pi RL}{\phi_{\text{in}}} \text{Peff}} \right] \times 100 \quad (4)$$

Naringenin and metabolites were analysed in the collected perfusate at 10-min intervals. For the main metabolites, a linear trapezoidal method was used to calculate the area under the lumen concentration curve AUC (normalised by the inlet perfusion concentration of naringenin) from time zero until the last sample, using the WinNonlin[®] software version 6.3 (2012 Certara, L.P.). AUC values were expressed in min.

In perfusate (60 min), plasma and bile samples, the percentage of each metabolite with respect to the inlet naringenin perfusion solution (C_{in}) was calculated according to equation 5:

$$\% C_{\text{met}} = (C_{\text{met}} \times 100) / C_{\text{in}} \quad (5)$$

where C_{met} is the concentration of each metabolite in the sample.

Table 2. Naringenin effective permeability coefficients (Peff) and percentage of absorption in each gastrointestinal segment

(Mean values and standard deviations)

	Peff ($\times 10^{-4}$ cm/s)		Absorption (%)‡		n
	Mean	SD	Mean	SD	
Stomach	3.04	0.89	23.69	5.54	4
Small intestine	7.80	1.54	76.28*	6.78	4
Colon	5.49†	1.86	28.01†	7.37	5
Colon (rifaximin)	2.26	0.96	11.18	4.46	5

n, Number of replicates.

 * Mean value was significantly different from that for colon segments ($P < 0.05$; Student's *t* test).

 † Mean value was significantly different from that for rifaximin-treated colon segments ($P < 0.05$; Student's *t* test).

‡ Absorption for 10 cm in the small intestine and 2 cm in the colon.

Statistical analysis

The estimated concentrations at a range of times in the stability study were compared using a parametric statistical assay (ANOVA), followed by a Scheffe test, where appropriate.

The Peff and percentages of absorption in the small intestine and colon were compared by means of Student's *t* test after verifying their normal distribution (Kurtosis normality of residuals) and the homogeneity of variance (modified – Levene equal – variance test). The same test was applied to study the influence of antibiotic treatment on the absorption of naringenin in the colon (comparison made between the control group and the group treated with rifaximin) (Table 2).

The amount of NAR-GLU and NAR-SULF (expressed as AUC) in the lumen in each gastrointestinal segment, and their percentages (60 min) in the lumen, bile and plasma in the two groups were compared using the Mann–Whitney *U* test, after rejecting their normal distribution and the homogeneity of variance (Fig. 2 and Table 3, respectively).

The mean AUC of the colonic metabolites in the control and rifaximin-treated groups (Table 4) was compared by the Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by the Kruskal–Wallis multiple-comparison *Z* test, after rejecting their normal distribution and the homogeneity of variance. Moreover, to determine differences in metabolites between the two groups (control and rifaximin-treated), the data were analysed using Student's *t* test.

In all cases, the level of significance was 5% ($P < 0.05$) and NCSS97 statistical software was used.

Results

Suitability of the diet

Three aliquots of the polyphenol-free diet were analysed by HPLC-ESI-MS/MS after polyphenol extraction, modifying the method used by Vallverdú-Queralt *et al.*⁽²⁵⁾. The chromatograms showed the absence of naringenin, naringenin-metabolites and other polyphenols. The body weight of the animals on the polyphenol-free diet remained steady.

Stability and solubility studies

Fig. 1(a)–(c) shows the naringenin stability at the pH of the absorption studies. Naringenin was stable at pH 2 for 3 h at 37°C ($P = 0.716$), whereas at pH 6.2 and 7.2 it was only stable for 2 h.

Fig. 1(d) shows the pH-solubility profile of naringenin in the pH range studied. The solubility increased with the pH according to the acidic nature of the compound, and ranged between 22.88 (SD 0.60) µg/ml at pH 1 and 46.86 (SD 0.38) µg/ml at pH 7.2.

In situ absorption studies of naringenin in the stomach, small intestine and colon

The Peff and the absorption percentage in mice using an *in situ* single-pass perfusion technique for each intestinal segment are shown in Table 2. Also included are the results of naringenin absorption in the colon after treatment with the antibiotic rifaximin.

The highest permeability was obtained in the small intestine (Peff = 7.80 (SD 1.54) $\times 10^{-4}$ cm/s), followed by the large intestine (Peff = 5.49 (SD 1.86) $\times 10^{-4}$ cm/s), while the lowest was in the stomach (Peff = 3.04 (SD 0.89) $\times 10^{-4}$ cm/s).

The percentage of naringenin was highest in plasma samples from a small intestine perfusion assay (29.10 (SD 6.72)%), being lower in the colon samples (0.68 (SD 0.19)%), while none was found in the stomach samples. Naringenin was not excreted into the bile intact.

Regional differences in naringenin metabolism

The mean areas and standard deviations under the lumen concentration curve (AUC) from time zero until the last sample of the metabolites NAR-GLU and NAR-SULF are shown in Fig. 2. Results of the statistical analysis are also

Table 3. Percentage of naringenin sulfate (NAR-SULF) and naringenin glucuronide (NAR-GLU) in perfusate (60 min), bile and plasma in the three gastrointestinal segments

(Mean values and standard deviations)

	NAR-SULF (%)		NAR-GLU (%)	
	Mean	SD	Mean	SD
Stomach				
Perfusate	0.007*†	0.004	0.03*†	0.006
Bile	ND		ND	
Plasma	ND		9.260*†	2.200
Small intestine				
Perfusate	84.00†	12.14	8.40†	5.67
Bile	ND		ND	
Plasma	ND		22.86†	8.38
Colon				
Perfusate	3.66	1.75	0.16	0.03
Bile	ND		ND	
Plasma	ND		2.990	1.610

ND, not detected.

 * Mean value was significantly different from that for small intestine segments ($P < 0.05$; Mann–Whitney *U* test).

 † Mean value was significantly different from that for colon segments ($P < 0.05$; Mann–Whitney *U* test).

Table 4. AUC of the metabolites in colonic lumen in control mice and in mice treated with rifaximin (Mean values and standard deviations)

	AUC (min)							
	NAR-GLU		NAR-SULF		4-Hydroxyhippuric acid		Hippuric acid	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	0.079*	0.027	2.616	1.347	0.219*†	0.072	0.168*	0.012
Treated	0.042*	0.044	4.207	2.326	0.072*‡	0.036	0.062*	0.001

NAR-GLU, naringenin glucuronide; NAR-SULF, naringenin sulfate.

* Mean value was significantly different from that for NAR-SULF ($P < 0.05$; Kruskal–Wallis Z test).

† Mean value was significantly different from that for NAR-GLU ($P < 0.05$; Kruskal–Wallis Z test).

‡ Mean value was significantly different from that of the control group ($P < 0.05$; Student's *t* test).

included. It should be noted that the units of the area are min (and the concentration units cancel out) due to the normalisation of the metabolite concentration by the inlet concentration of naringenin. The highest significant ($P < 0.05$) levels of metabolites were observed in the small intestine, followed by the colon. In both intestinal regions, the main metabolite was NAR-SULF. In the stomach, higher levels of NAR-GLU *v.* NAR-SULF were obtained.

In Table 3, the mean percentages and standard deviations of each phase II metabolite at 60 min in perfusate, bile and plasma are shown. In general, a higher percentage of NAR-GLU was observed in plasma *v.* perfusate for the three gastrointestinal segments. NAR-SULF was not detected in plasma, and neither metabolite was found in the bile.

Effects of the antibiotic treatment on the absorption and metabolism of naringenin

Effects of the antibiotic treatment on naringenin absorption are shown in Table 2. As can be observed, the pretreatment with rifaximin reduced ($P < 0.05$) the P_{eff} of naringenin in the large intestine (5.49 (SD 1.86) $\times 10^{-4}$ cm/s *v.* 2.26

(SD 0.96) $\times 10^{-4}$ cm/s in control mice and pretreated animals, respectively). Table 4 shows the naringenin metabolites in the colonic lumen, and Table 5 includes the metabolites found in the bile and plasma.

In the colonic lumen, the predominant metabolite (expressed in terms of AUC) was NAR-SULF, followed by 4-hydroxyhippuric acid, hippuric acid and NAR-GLU, and when mice were pretreated with rifaximin, a significant decrease was only observed for 4-hydroxyhippuric acid (AUC 0.219 (SD 0.072) min *v.* 0.072 (SD 0.036) min, respectively).

The microbial metabolites 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, 3-phenylpropionic acid and (4-hydroxyphenyl) acetic acid were found in the bile and plasma (Table 5) and no significant differences were observed between the two groups of mice, except in (4-hydroxyphenyl) acetic acid.

Discussion

Stability and solubility studies

Results showed that naringenin was more stable at acidic than at basic pH. However, in the perfusion buffers, it was stable

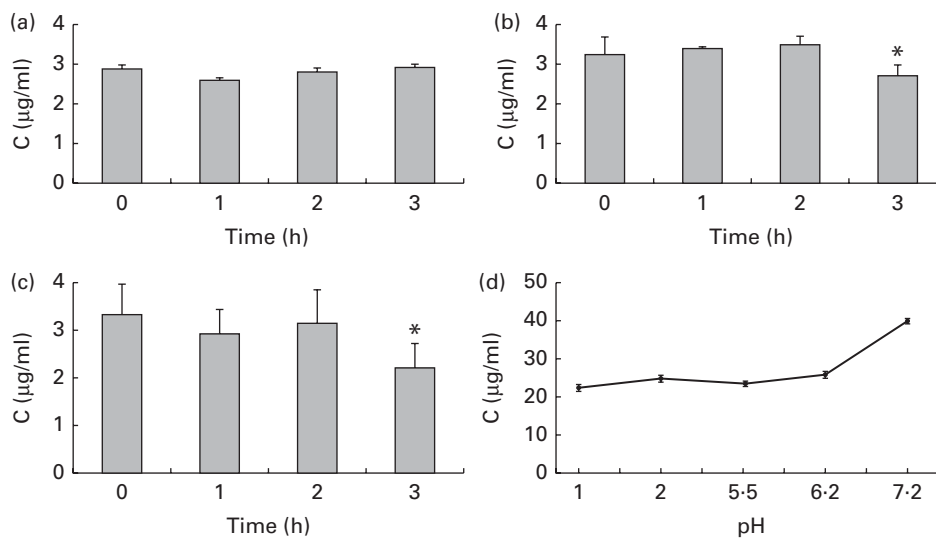


Fig. 1. Mean concentrations of naringenin (C) in the perfusion buffers *v.* time in the stability assay at pH 2 (a), pH 6.2 (b) and pH 7.2 (c); and the pH-solubility profile of naringenin (d). Values are means and standard deviations represented by vertical bars. *Mean value is significantly different from that at time 0 ($P < 0.05$).

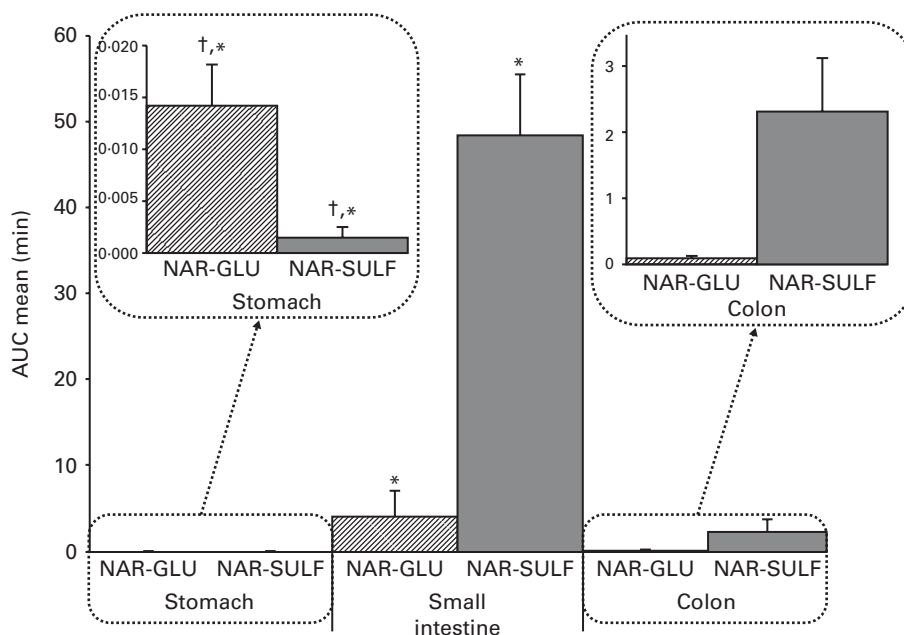


Fig. 2. Area under the lumen concentration curve of naringenin glucuronide (NAR-GLU) and naringenin sulfate (NAR-SULF) in stomach, small intestine and colon (*n* 6, 4 and 6, respectively). Values are means and standard deviations represented by vertical bars. *Mean value is significantly different from that of colon ($P < 0.05$). †Mean value is significantly different from that of small intestine ($P < 0.05$).

at pH 2, 6.2 and 7.2 for the time required to perform the permeation experiments.

According to the BCS⁽⁵⁾, a compound is considered highly soluble when the highest dose strength is soluble in 250 ml or less of aqueous media over the pH range of 1–7.5. As naringenin is a dietary compound, it cannot be treated as a drug – in terms of dose strength – when testing for solubility. However, according to the values obtained ($< 0.0047\%$), it can be considered as a compound with low solubility. Nonetheless, if we consider the lowest value of solubility at 37°C, which occurs under the most acidic conditions (22.88 (SD 0.60) µg/ml at pH 1), it is still higher than the concentration of naringenin in food sources. Therefore, the higher solubility of naringenin at physiological pH values is not expected to be a limiting factor in the absorption of naringenin after its oral ingestion.

In situ absorption studies of naringenin in the stomach, small intestine and colon

The Peff obtained in the three gastrointestinal regions showed that more naringenin was absorbed in the small intestine than in the stomach and colon (7.80 (SD 1.54) $\times 10^{-4}$ cm/s *v.* 3.04 (SD 0.89) $\times 10^{-4}$ cm/s and 5.49 (SD 1.86) $\times 10^{-4}$ cm/s, respectively). However, this parameter did not differ significantly between the small and large intestines. In the present study, the permeability of naproxen, as a model of a highly permeable compound, was also assayed in the small intestine. The Peff obtained (6.39 (SD 1.23) $\times 10^{-4}$ cm/s) was similar to that for naringenin (7.80 (SD 1.54) $\times 10^{-4}$ cm/s), indicating that naringenin permeability was high and maintained throughout the small intestine and colon. Both compounds (naringenin and naproxen) have a low molecular weight

Table 5. Percentage (%) of phase II and microbial metabolites in the bile (pooled sample) and plasma from colon perfusion experiments in control mice and in mice treated with rifaximin (Mean values and standard deviations; *n* 5–6)

	Bile		Plasma			
			Control		Treated	
	Control	Treated	Mean	SD	Mean	SD
NAR-GLU	ND	ND	2.99	1.61	0.49*	0.31
NAR-SULF	ND	ND	ND	ND	0.70	0.20
3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	7.43	8.30	10.34	3.14	13.63	4.18
4-Hydroxyhippuric acid	41.97	20.01	1.12	0.76	1.49	0.70
Hippuric acid	3.28	1.10	1.87	0.80	1.45	0.44
3-Phenylpropionic acid	48.11	125.68	59.77	15.39	60.39	16.40
(4-Hydroxyphenyl) acetic acid	16.88	2.54	1.97	0.91	3.66†	0.75

NAR-GLU, naringenin glucuronide; ND, not detected; NAR-SULF, naringenin sulfate.
 *Mean value was significantly different from that of the control group ($P < 0.05$; Mann–Whitney *U* test).
 †Mean value was significantly different from that of the control group ($P < 0.05$; Student's *t* test).

and high lipophilicity (expressed as $\log P$) (272.25 g/mol and $\log P=2.84^{(26)}$ *v.* 230.26 g/mol and $\log P=2.52^{(4)}$ for naringenin and naproxen, respectively), properties that favour intestinal absorption. Fagerholm and colleagues⁽²⁷⁾ and Masaoka *et al.*⁽²²⁾ found similar results for naproxen in rats: the decrease in P_{eff} from the proximal to the distal intestine was less pronounced for the more lipophilic compounds, and the permeability was similar in the jejunum, ileum and colon. Based on these results, although naringenin has been described as a substrate of P-glycoprotein and MRP-2 (efflux proteins) and MRP-1 (influx) ATP-dependent transporters⁽⁴⁾, the main route of absorption for naringenin is by passive diffusion. However, this can lead to pharmacokinetic interactions with other drug/compound substrates of the same transporters, as described by Takanaga *et al.*⁽²⁸⁾, Bailey *et al.*⁽²⁹⁾ and Le Goff *et al.*^(30,31). In this respect, naringenin is also an inhibitor of the isoform CYP3A4, which plays an important role in the metabolism of many drugs⁽³²⁾.

Regarding permeability in the stomach, the P_{eff} values were not comparable with those for the intestine because of the different flow rate used in the experiments (0.16 *v.* 0.2 ml/min, respectively). Komiya *et al.*⁽²⁴⁾ demonstrated that the permeability and percentage absorbed could change due to differences in residence time in the organ caused by the flow rate. The fraction absorbed is expected to be higher with lower flow rates, because as residence time increases, the molecule has more opportunities to be absorbed. However, the results obtained for naringenin show that the P_{eff} in the stomach was lower than in the small intestine and colon, although still significant.

As shown in Table 2, the absorption percentage did not always correspond to the P_{eff} . For example, one could expect a higher absorption percentage in the colon according to the P_{eff} . This variance can be attributed to the different length segments used in the experiments: 1.5–2 cm in the colon, 10–15 cm in the small intestine and 1.1–1.35 cm in the stomach (and in this case, assuming a cylindrical shape). Parameter L (equations 1 and 4) affects the percentage absorbed more than the P_{eff} . These results are consistent with Komiya *et al.*⁽²⁴⁾, who studied the fraction absorbed and the P_{eff} of seven steroids in rats using different lengths of the intestine.

Regional differences in naringenin metabolism

With the aim of studying the intestinal first-pass metabolism, lumen samples, bile and blood (60 min) taken from the stomach, small intestine and colon assays were examined for the presence of metabolites. The main phase II metabolites found in the intestinal perfusion samples were mainly NAR-SULF, followed by NAR-GLU ($P<0.05$).

The mean AUC values for these metabolites in each gastrointestinal segment are shown in Fig. 2. Considering the total conjugates excreted, their levels according to site were ranked: small intestine > colon > stomach. The AUC for NAR-SULF was 48.314 (SD 7.166) min, 2.616 (SD 1.347) min and 0.001 (SD 0.002) min, for the small intestine, colon and stomach, respectively. Chen *et al.*⁽³³⁾ studied the distribution of human gastrointestinal sulfotransferases and demonstrated that the small intestine has higher sulfation activity than either the stomach or the colon, which is consistent with the present study results. Similar behaviour was observed for the uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases (UDP glucuronosyltransferases), whose activity was also higher in the small intestine (AUC of NAR-GLU 4.072 (SD 2.948) min *v.* 0.079 (SD 0.027) min and 0.014 (SD 0.006) min, for the colon and stomach, respectively). Gregory *et al.*⁽³⁴⁾ and Xu *et al.*⁽¹⁾ obtained similar results.

In the lumen, the main metabolites excreted were sulfates, as in human subjects⁽⁷⁾. Sulfation is generally a higher-affinity, lower-capacity pathway than glucuronidation⁽³³⁾. In the present study, according to the low concentration assayed, higher sulfate production was expected. Both metabolites (sulfates and glucuronides) started to appear 5 min after starting the perfusion, but at different levels (Fig. 3). At 60 min, the mean percentage of NAR-SULF was 84.00 (SD 12.14)% in the small intestine, whereas for glucuronide it was 8.40 (SD 5.67)% (Table 3). In other words, the levels of NAR-SULF from 10 to 60 min (steady levels) were in the same order of magnitude as the parent compound, while those of NAR-GLU were lower (with a steady profile from approximately 30 min).

Only NAR-GLU (and not NAR-SULF) was found in the plasma and the highest percentage was obtained in the plasma of small intestine assays (22.86 (SD 8.38)%). Neither NAR-GLU nor NAR-SULF was detected in the bile. Contradictory results have been found by other authors: Fang *et al.*⁽³⁵⁾, who studied the bioavailability of naringenin and naringin after oral administration in rats, reported a far higher plasma

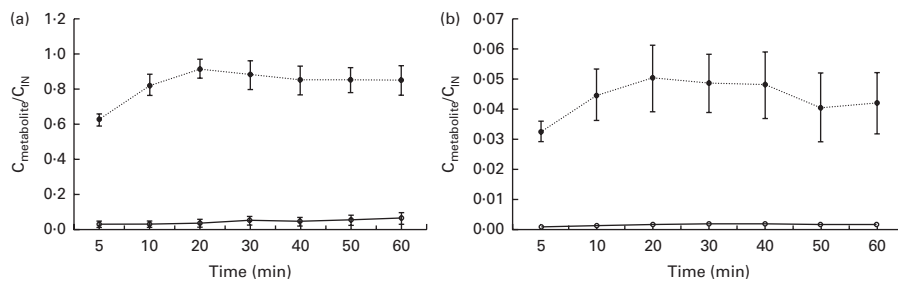


Fig. 3. Concentration of metabolites ($C_{metabolite}$) naringenin glucuronide (—○—) and naringenin sulfate (—●—) normalised to the inlet concentration (C_{IN}) of naringenin *v.* time in the small intestine (a) and colon (b). Values are means, with their standard errors represented by vertical bars.

profile of NAR-SULF than of NAR-GLU (5.4 times higher in terms of AUC), while Xu *et al.*⁽¹⁾ found significant amounts of NAR-GLU in rat bile, more than double that of intestinal lumen samples, using a similar intestinal perfusion technique.

According to the present study results and the high levels of sulfates found in the lumen with respect to the plasma and bile, we suggest that naringenin sulfation in mice occurs mainly in the enterocytes rather than in the liver. Further research is required to study the sulfotransferases involved in the intestinal metabolism of naringenin. Regarding glucuronisation, the process seems to take place in both the intestinal cells and the liver, and the isoform UDP glucuronosyltransferases 1A localised in the endoplasmic reticulum of the enterocytes plays an important role in the first-pass metabolism of naringenin and other polyphenols⁽³⁶⁾.

Effect of the antibiotic treatment on the absorption and metabolism of naringenin

The aim of this part of the work was to study the influence of the microbiota on the absorption and metabolism of naringenin.

As can be observed in Table 2, pretreatment with rifaximin reduced the permeability of naringenin in the large intestine ($P < 0.05$). This reduction in absorption is in accordance with the lower percentage of NAR-GLU observed in plasma (Table 5) of the rifaximin-treated mice compared to the control group (0.49 (SD 0.31)% *v.* 2.99 (SD 1.61)%, respectively) as well as a decrease in the percentage of naringenin in plasma (from 0.68 (SD 0.19)% to 0.37 (SD 0.09)% for treated mice). In contrast, plasma NAR-SULF increased in rifaximin-treated mice, although the percentage was quite low (0.7 (SD 0.2)%).

In the colonic perfusion samples (Table 4), the amounts of phase II metabolites (NAR-GLU and NAR-SULF) did not differ significantly ($P > 0.05$) between the two groups. As they are mainly intestinal and hepatic metabolites, differences were not expected.

Regarding the microbial metabolites, naringenin can be metabolised to a wide range of low-molecular-weight aromatic acids such as phloroglucinol, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, (4-hydroxyphenyl) acetic acid, 3-phenylpropionic acid, 4-hydroxyhippuric acid and hippuric acid^(37–39). Based on the present study results (Tables 4 and 5), a scheme of the colonic metabolic pathway of naringenin is

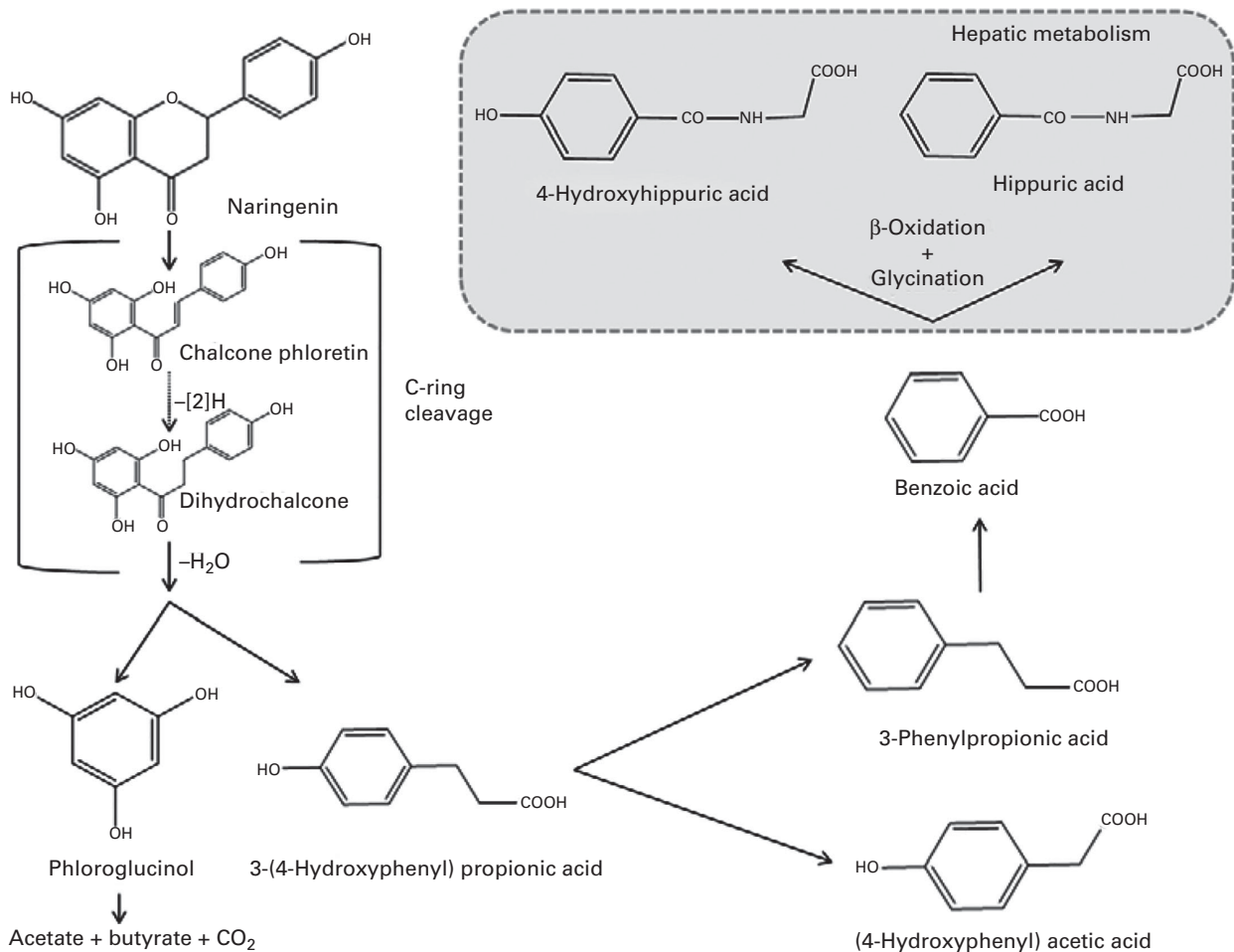


Fig. 4. Main metabolic pathway tentatively proposed for the colonic metabolism of naringenin^(37–39,42).

proposed in Fig. 4. As shown, 3-phenylpropionic acid may be biotransformed to benzoic acid, absorbed (by the monocarboxylic acid transporter 1) and subjected to glycination and β -oxidation in the liver, yielding hippuric acid and 4-hydroxyhippuric acid^(37,40–43). This pathway justifies the presence of 4-hydroxyhippuric acid and hippuric acid in the bile and plasma. On the other hand, the presence of these metabolites in the colonic perfusates (Table 4) under our experimental conditions (bile duct tied) could be explained by intestinal secretion. Although hippuric acid can be derived from sources other than polyphenols, such as aromatic amino acids⁽³⁶⁾, the relatively high levels obtained may be associated with the dose of naringenin administered. Phloroglucinol was not detected in the present study and is rarely recovered as a final metabolite, as it can be degraded into acetate, butyrate and CO₂⁽³⁸⁾.

There was a lack of hydroxyphenyl propionic acids and hydroxyphenyl acetic acids (intermediate metabolites) in the perfusate samples, although we detected and quantified 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, 3-phenylpropionic acid and (4-hydroxyphenyl) acetic acid in the plasma and bile. This absence could be attributed to rapid intestinal absorption of the phenolic acids after their formation. Konishi & Kobayashi⁽⁴⁴⁾ reported the permeation of 3-(3,4-dihydroxyphenyl) propionic acid via the paracellular pathway and of 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid by the monocarboxylic acid transporter. No significant differences in 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid in the plasma and bile were found between the two experimental groups (control and treated with rifaximin), in contrast with the derived metabolites (3-phenylpropionic acid and (4-hydroxyphenyl) acetic acid) in bile. The high percentage of 3-phenylpropionic acid found in the samples was striking, although it can be considered as reasonable, since its presence in biological samples may be attributed to the bacterial metabolic action of dietary polyphenols as well as dietary phenolic amino acids such as phenylalanine and tyrosine^(45,46).

In principle, we would expect higher levels of microbial metabolites in control animals than in those treated with rifaximin, but no significant differences were observed between the two groups. These results suggest that the antibiotic treatment did not totally eliminate the intestinal microbiota but probably altered it. Gao and colleagues⁽⁴⁷⁾ reported that rifaximin alters the bacterial population in the ileum of rats, leading to a relative abundance of *Lactobacillus* species. In the present study, an increase in 3-phenylpropionic acid in the bile and in (4-hydroxyphenyl) acetic acid in the plasma of rifaximin-treated mice was observed.

On the other hand, taking into account the relatively high percentage of microbial metabolites found in the biological samples, it is of great interest to consider their possible contribution to the human health benefits attributed to the parent compound naringenin. In this context, microbial metabolites such as hydroxylated 3-phenylpropionic acids and hydroxylated phenylacetic acids retain antioxidant properties, while others such as (4-hydroxyphenyl) acetic acid are reported to be more effective than their parent compounds (rutin and quercetin) in inhibiting platelet aggregation *in vitro*⁽⁴⁴⁾.

Miène and colleagues⁽⁴⁸⁾ also report anti-inflammatory activity of (3,4-dihydroxyphenyl) acetic acid and 3-(3,4-dihydroxyphenyl) propionic acid in human colon cells. It could be extrapolated from these results that if naringenin were ingested in the diet, the food matrix would favour the production of microbial metabolites, since prebiotic and probiotic compounds can stimulate intestinal fermentation and the activity of the colonic microbiota⁽³⁶⁾. The matrix could even bind or occlude naringenin, thereby hampering its absorption and increasing the residence time of unabsorbed naringenin in the gut and making it more available for the activity of the microbiota.

Conclusions

The present study results show that naringenin is a highly permeable compound (comparable to naproxen) and is absorbed throughout the gastrointestinal tract, but mainly in the small intestine and by a passive diffusion mechanism. Neither its permeability nor solubility at physiological pH values are expected to be a limiting factor in the bioavailability of naringenin after its dietary ingestion.

The low oral bioavailability of naringenin can be attributed to a high intestinal first-pass effect, and, to a lesser degree, to hepatic metabolism. The high intestinal first-pass metabolism of naringenin leads to a high level of phase II metabolites (mainly naringenin-*O*-sulfate in the intestinal lumen), which – due to an enterohepatic cycle – would extend the presence of naringenin within the organism. The main sulfation and glucuronidation activity was found in the small intestine, followed by the colon and stomach. The treatment with rifaximin (50 mg/kg) led to a decrease in the absorption of naringenin but not to a significant reduction in any of the microbial metabolites formed.

According to the present study results, the health effects associated with dietary naringenin seem to be more closely related to the high level of bioactive metabolites formed than to its bioavailability. However, further pharmacodynamics and metabolic studies are needed to confirm this statement.

Acknowledgements

The present study was supported in part by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2010-22319-C03, AGL2013-49083-C3-1-R) and by the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 773). The Ministerio de Economía y Competitividad, (CIBEROBN) Instituto de Salud Carlos III and the Generalitat de Catalunya had no role in the design, analysis or writing of this article.

Contributions of authors were as follows: All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of analyses. All authors were involved in the conception and design of the study, the collection and assembly of data and the analysis and interpretation of the data. N. O.-L. and E. E.-F. wrote the article but the intellectual content of the manuscript was critically revised by all the authors.

None of the authors has any conflicts of interest.

References

- Xu H, Kulkarni KH, Singh R, *et al.* (2009) Disposition of naringenin via glucuronidation pathway is affected by compensating efflux transporters of hydrophilic glucuronides. *Mol Pharm* **6**, 1703–1715.
- Yoshimura M, Sano A, Kamei J, *et al.* (2009) Identification and quantification of metabolites of orally administered naringenin chalcone in rats. *J Agric Food Chem* **57**, 6432–6437.
- Felgines C, Texier O, Morand C, *et al.* (2000) Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G1148–G1154.
- Chabane MN, Al Ahmad A, Peluso J, *et al.* (2009) Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol* **61**, 1473–1483.
- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, *et al.* (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **12**, 413–420.
- Azuma K, Ippoushi K, Ito H, *et al.* (2002) Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J Agric Food Chem* **50**, 1706–1712.
- Jeong EJ, Jia X & Hu M (2005) Disposition of formononetin via enteric recycling: metabolism and excretion in mouse intestinal perfusion and Caco-2 cell models. *Mol Pharm* **2**, 319–328.
- Escribano E, García Sala X, Salamanca J, *et al.* (2012) Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. *Int J Pharm* **436**, 472–477.
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, *et al.* (2004) Model of non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* **79**, 502–509.
- Vallverdú-Queralt A, De Alvarenga JF, Estruch R, *et al.* (2013) Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito. *Food Chem* **41**, 3365–3372.
- Martínez-Huelamo M, Tulipani S & Torrado X (2012) Validation of a new LC-MS/MS method for the detection and quantification of phenolic metabolites from tomato sauce in biological samples. *J Agric Food Chem* **60**, 4542–4549.
- Dahan A, West BT & Amidon GL (2009) Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *Eur J Pharm Sci* **36**, 320–329.
- Eisen EJ (1976) Results of growth curve analyses in mice and rats. *J Anim Sci* **42**, 1008–1023.
- Miglioli PA, Allerberger F, Calabró GB, *et al.* (2001) Effects of daily oral administration of rifaximin and neomycin on faecal aerobic flora in rats. *Pharmacol Res* **44**, 373–375.
- Scarpignato C & Pelosini I (2005) Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. *Chemothrapy* **51**, Suppl. 1, S36–S66.
- Tulipani S, Martínez-Huelamo M, Rotches Ribalta M, *et al.* (2012) Oil matrix effects on plasma exposure and urinary excretion of phenolic compounds from tomato sauces: evidence from a human pilot study. *Food Chem* **130**, 581–590.
- Varma MVS & Panchagnula R (2005) Prediction of *in vivo* intestinal absorption enhancement on *P*-glycoprotein inhibition, from rat *in situ* permeability. *J Pharm Sci* **94**, 1694–1704.
- Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, *et al.* (2007) Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *J Pharm Sci* **10**, 368–379.
- Sutton SC, Rinaldi MTS & Vukovinsky KE (2001) Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. *AAPS Pharm Sci* **3**, 1–5.
- Japar D, Wu SP, Hu Y, *et al.* (2010) Significance and regional dependency of peptide transporter (PEPT) 1 in the intestinal permeability of glycylsarcosine: *in situ* single-pass perfusion studies in wild-type and Pept1 knockout mice. *Drug Metab and Dispos* **38**, 1740–1746.
- Incecayir T, Tsume Y & Amidon GL (2013) Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Mol Pharm* **10**, 958–966.
- Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoba M, *et al.* (2006) Site of absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur J Pharm Sci* **29**, 240–250.
- McConnell EL, Basit AW & Murdan S (2008) Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for *in vivo* experiments. *J Pharm Pharm* **60**, 63–70.
- Komiya I, Park JY, Kamani A, *et al.* (1980) Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. *Int J Pharm* **4**, 249–262.
- Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huelamo, *et al.* (2014) A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem* **154**, 299–307.
- DrugBank (2014) DrugBank database (open data drug and drug target data base). <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03467> (accessed May 2014).
- Fagerholm U, Johansson M & Lennernäs H (1996) Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res* **13**, 1336–1342.
- Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, *et al.* (1998) Inhibition of vinblastine efflux mediated by *P*-glycoprotein by grapefruit juice components in Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* **21**, 1062–1066.
- Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, *et al.* (1998) Grapefruit juice-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* **46**, 101–110.
- Le Goff N, Koffel JC, Vandenschrieck S, *et al.* (2002) Comparison of *in vitro* hepatic models for the prediction of metabolic interaction between simvastatin and naringenin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **27**, 233–241.
- Le Goff-Klein N, Koffel JC, Jung L, *et al.* (2005) *In vitro* inhibition of simvastatin metabolism, a HMG-CoA reductase inhibitor in human and rat liver by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Eur J Pharm Sci* **18**, 31–35.
- Hsiu SL, Huang TY, Hou YC, *et al.* (2002) Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life Sci* **70**, 1481–1489.
- Chen G, Zhang D, Jing N, *et al.* (2003) Human gastrointestinal sulfotransferases: identification and distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* **187**, 186–197.
- Gregory P, Lewinsky R, Gardner-Stephen D, *et al.* (2004) Regulation of UDP glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**, 354–356.
- Fang T, Wang Y, Ma Y, *et al.* (2006) A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. *J Pharm Biomed Anal* **40**, 454–459.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–747.

37. Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, *et al.* (2004) Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med* **36**, 212–225.
38. Possimiers S, Bolca S, Verstraete W, *et al.* (2011) The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia* **82**, 53–66.
39. Boto-Ordóñez M, Rothwell JA, Andres-Lacueva C, *et al.* (2014) Prediction of the wine polyphenol metabolic space: an application of the Phenol-Explorer database. *Mol Nutr Food Res* **58**, 466–477.
40. Cong D, Fong AK, Lee R, *et al.* (2001) Absorption of benzoic acid in segmental regions of the vascularly perfused rat small intestine preparation. *Drug Metab Dispos* **29**, 1539–1547.
41. Gao K, Xu A, Krul C, *et al.* (2006) Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J Nutr* **136**, 52–57.
42. Aura AM (2008) Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* **7**, 407–429.
43. Serra A, Macià A, Romero MP, *et al.* (2012) Metabolic pathway of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavonones) and phenolic acids. *Food Chem* **130**, 383–393.
44. Konishi Y & Kobayashi S (2004) Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* **52**, 6418–6424.
45. Spoelstra SF (1978) Degradation of tyrosine in anaerobically stored piggery wastes and in pig feces. *Appl Environ Microbiol* **36**, 631–638.
46. Lord RS & Bradley JA (2008) Clinical applications of urinary organic acids. Part 2. Dysbiosis markers. *Altern Med Rev* **13**, 292–306.
47. Gao J, Gilliland MIII & Owyang C (2014) Rifaximin, gut microbes and mucosal inflammation: unravelling a complex relationship. *Gut Microbes* **5**, 571–575.
48. Miene C, Weise A & Gleis M (2011) Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). *Nutr Cancer* **63**, 653–662.

Publicación 2.

Orrego-Lagarón, Naiara, Vallverdú-Queralt, Anna, Martínez-Huélamo, Miriam, Lamuela-Raventos, Rosa María & Escribano-Ferrer, Elvira. *Metabolic profile of naringenin in the stomach and colon using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-ORBITRAP-MS) and LC-ESI-MS/MS*. J. Pharm. Biomed. Anal. **120**, 38–45 (2016).

Resumen: La naringenina es un flavonoide que se encuentra mayoritariamente en productos cítricos y hortalizas como el tomate. A pesar de su baja biodisponibilidad oral (Xu *et al.* 2009), se le atribuyen varias actividades biológicas como capacidad antioxidante, antiinflamatoria o/ anticarcinogénica. Tras su ingesta, la naringenina sufre muchos cambios metabólicos durante su recorrido por el tracto gastrointestinal: enzimas entéricos, hepáticos y microbianos provocan cambios en su estructura que dan lugar a diferentes metabolitos, alguno de los cuales de reconocida actividad biológica. En este estudio se pretenden proporcionar nuevos datos sobre el metabolismo que sufre la naringenina en las zonas del tracto gastrointestinal menos estudiadas (estómago y colon), ampliando el conocimiento sobre su perfil metabólico hasta ahora conocido. Con este objetivo, las muestras de perfusión (lumen) obtenidas durante los ensayos de “perfusión intestinal *in situ* en ratón” en estómago y colon, se analizaron mediante dos técnicas cromatográficas: el HPLC-ESI-MS/MS y el LC-ESI-LTQ-Orbitrap. El primero es un método ampliamente utilizado en la cuantificación de flavonoides y de sus metabolitos (Martínez-Huelamo *et al.* 2012), sin embargo su baja sensibilidad comparado con el Orbitrap puede dar lugar a límites de detección relativamente altos, que impidan la identificación de compuestos a concentraciones bajas. Es el caso de los metabolitos provenientes de la naringenina administrada a concentraciones bajas (3.5 µg/mL) en los ensayos de perfusión intestinal *in situ* en ratón. La combinación de esta técnica con el LC-ESI-LTQ-Orbitrap (con mayor nivel de sensibilidad), podría permitir la identificación de nuevos compuestos. Hasta la fecha éste es el primer estudio en profundidad del metabolismo de la naringenina a nivel de estómago en ratón. La combinación de ambas técnicas ha permitido identificar tres metabolitos adicionales: apigenina (metabolito de fase I), ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico y floroglucinol (ambos metabolitos microbianos) en estómago. Por otra parte, a nivel de colon, el uso de LC-ESI-LTQ-Orbitrap permitió la identificación del doble de metabolitos que el uso exclusivo de LC-ESI-MS/MS.



Metabolic profile of naringenin in the stomach and colon using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) and LC-ESI-MS/MS



Naiara Orrego-Lagarón^a, Anna Vallverdú-Queralt^{b,c}, Miriam Martínez-Huélamo^{c,d}, Rosa M. Lamuela-Raventos^{c,d}, Elvira Escribano-Ferrer^{a,c,*}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN₂UB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

^b INRA, UMR1083 Sciences Pour l'Œnologie, 2 Place Pierre Viala, Montpellier Cedex 34060, France

^c CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, E-28029 Madrid, Spain

^d Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2015

Received in revised form 28 October 2015

Accepted 29 October 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

Naringenin

Metabolism

Intestinal perfusion

Mice

LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

LC-ESI-MS/MS

ABSTRACT

Several biological activities (antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic) are attributed to naringenin (NAR)—a predominant flavonoid of citrus fruit and tomato—despite its low bioavailability after ingestion. NAR undergoes extensive metabolism when crossing the gastrointestinal tract, resulting in enteric, hepatic and microbial metabolites, some of them with recognized beneficial effects on human health. This study sought to provide new insights into the metabolism of NAR in regions of the gastrointestinal tract where it has been less studied: the stomach and colon. With this purpose, liquid chromatography coupled with an electrospray ionization hybrid linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry technique (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) was used for an accurate identification of NAR metabolites, and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) on a triple quadrupole was used for their identification and quantification. The combination of both analytical techniques provided a broader metabolic profile of NAR. As far as we know, this is the first in-depth metabolic profiling study of NAR in the stomach of mice. Three of the metabolites determined using the LC-LTQ-Orbitrap could not be identified by LC-ESI-MS/MS in stomach perfusion samples: apigenin, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid and phloroglucinol. The number of colonic metabolites determined using the LTQ-Orbitrap-MS was more than twice the number identified by LC-ESI-MS/MS.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

NAR, a polyphenol found in tomato and citrus fruits, has been attracting increasing interest in clinical nutrition and disease prevention. Although the health properties of flavonoids are attributed

Abbreviations: NAR, naringenin; LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, liquid chromatography coupled with an electrospray ionization hybrid linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry technique; LC-ESI-MS/MS, liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry; NAR-GLU, naringenin-4, 7-O-glucuronide; NAR-SULF, naringenin-sulfate.

* Corresponding author at: Elvira Escribano-Ferrer, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Dpt., Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, Barcelona 08028, Spain. Fax: +34 9340 35937.

E-mail address: eescribano@ub.edu (E. Escribano-Ferrer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.040>

0731-7085/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

to their bioavailability after ingestion, the oral bioavailability of NAR is very low, less than 10% [1], due to a high intestinal and hepatic first-pass metabolism [1–3]. The resulting metabolites are mainly phase II, formed after the addition of glucuronide and/or sulfate groups to the molecule, and to a lesser extent, phase I. In addition, when NAR reaches the colon, it can also be metabolized by the microbiota. The majority of these microbial metabolites are synthesized by C-ring cleavage and subsequent hydrophilic changes [4,5]. The transformation of NAR while crossing the small intestine [6–8] and by microbial effects in the colon [4,9,10] has been extensively studied, but there is less information about possible molecular changes during its transit through the stomach or due to enteric metabolism in colon mucosal cells. It has been demonstrated the existence of enzymes like glucotransferases and sulfotransferases, responsible of NAR glucuronidation and sulfation,

respectively, in both levels [11,12], as well as catechol-*O*-methyltransferases (COMTs) and glutathione-*S*-transferases (GSTs) which are also responsible for flavonoids metabolism [9]. Although the stomach has long been considered as too acidic for bacterial survival, some recent studies have shown that it harbors a large number of acid-resistant bacterial strains, including *Streptococcus* sp., *Neisseria* sp. and *Lactobacillus* sp., albeit with a content generally 10^3 times lower than in the colon [13,14]. Additionally, Zhao et al. [15] and Crespy et al. [16] described the metabolic pathways of ferulic acid and quercetin, respectively, in the stomach, postulating that 4% of the metabolism takes place in the gastric mucosa.

Even after undergoing extensive metabolism, NAR continues to show biological effects. Among numerous studies on the beneficial impact of NAR metabolites on human health, Larrosa et al. [17] demonstrated the anti-inflammatory activity in distal colon mucosa of 3-(4-dihydroxyphenyl) propionic acid, one of the naringenin fermentation products. Similarly, Monagas et al. [18] reported that dihydroxylated phenolic acids, such as 3-(4-dihydroxyphenyl) propionic acid, have strong anti-inflammatory activity.

Based on these considerations, an in-depth knowledge of NAR metabolism throughout the gastrointestinal tract is of great interest, especially the less studied regions, such as the stomach and colon. LC-ESI-MS/MS methods are widely used to quantify flavonoids and their metabolites [19], although their low sensitivity can sometimes result in overly high detection limits. This constitutes a limitation in the analysis of biological samples, such as mice perfusion samples from *in situ* absorption studies, when concentration of the parent compound is low, and subsequently the levels of its metabolites are lower. Overcoming these shortcomings, high resolution/accurate mass measurements mass spectrometry techniques, such as linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS), have proven to be a reliable tool for supplying molecular weight information (FTMS scan) and structural data (MS^n experiments). Thus, the greater sensitivity of LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS allows compounds to be identified at lower concentrations with more accurate precision [20–23]. In recent years, the combined use of both techniques has grown dramatically, as they provide data for a wider range of metabolites [24,25]. Hence, our study focused on determining the metabolic profile of NAR in mouse stomach and colon, combining two analytical techniques, liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) and liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS).

The aims of the present work were: (i) to evaluate the intestinal and hepatic first-pass effect on NAR bioavailability through the detection and quantification of NAR metabolites in gastric and colonic lumen samples by LC-ESI-MS/MS; (ii) to identify and confirm the maximum number of NAR metabolites in perfusion samples by an LTQ-Orbitrap, and (iii) to obtain the broadest possible metabolic profile of NAR by applying both analytical techniques, which is crucial for the elucidation of compounds responsible for the biological effects of NAR.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All samples and standards were handled protected from UV radiation. NAR, phloroglucinol, 3-phenylpropionic acid, (4-hydroxyphenyl) acetic acid, hippuric acid and phenol red were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain); naringenin-4-*O*-glucuronide (NAR-GLU) and naringenin-7-*O*-glucuronide (NAR-

GLU) were purchased from the Cayman Chemical Company (Michigan, USA), and 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid was provided by Extrasynthese (Genay, France). Ethanol, acetonitrile, formic acid and glacial acetic acid of HPLC grade were obtained from Scharlau Chemie, S.A (Barcelona, Spain) and water from a Milli-Q ultrapure water system (Millipore, Bedford, USA).

2.2. Perfusion experiments

The studies were conducted following a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain (trial nr. CEEA 219/12).

Single-pass intestinal perfusion was performed in anesthetized CD1 mice (30–35 g) according to the method described by Escribano et al. [26], adapting the method for the stomach and colon. Six animals fed with a polyphenol-free diet for one week were used for each biological segment (stomach and colon). More detailed information about the diet, anesthesia and surgical procedure has been described previously [3].

The perfusion solution was isosmotic and contained NAR (3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and phenol red (0.1 mg/mL) adjusted to pH 7.2 and pumped at a flow rate of 0.20 mL/min for the colon assay and to pH 2 and pumped at 0.16 mL/min for the stomach. The outflow perfusate was collected in 1.5 mL amber eppendorfs at 10 min intervals for 60 min. Samples were centrifuged (7516.3 g for 10 min at 4 °C) (Centrifuge 5415R, Hamburg, Germany) and 650 μL aliquots of the supernatant were spiked with the addition of 50 μL of ethanol and stored frozen (–80 °C) until analysis. All perfusion samples were analyzed by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS and LC-ESI-MS/MS to identify and quantify the parent compound and the phenolic metabolites.

2.3. LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS

For accurate mass measurements, a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with an ESI source working in negative mode was used. Operation parameters were as follows: source voltage, 4 kV; sheath gas, 20 (arbitrary units); auxiliary gas, 10 (arbitrary units); sweep gas, 2 (arbitrary units); and capillary temperature, 275 °C. Default values were used for most other acquisition parameters (Fourier transformation (FT) Automatic gain control (AGC) target 5×10^5 for MS mode and 5×10^4 for MS^n mode). Perfusion samples were analyzed in data dependent scan mode at a resolving power of 60,000 at m/z 400. The most intense ions were selected, and parent ions were fragmented by high-energy C-trap dissociation (HCD) with normalized collision energy of 45% and an activation time of 100 ms. The maximum injection time was set to 100 ms with two micro scans for MS mode and to 1000 ms with one micro scan for MS^n mode. The mass range was from m/z 100 to 1000.

Data were analyzed using XCalibur software v. 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific). An external calibration for mass accuracy was carried out the day before the analysis according to the manufacturer's guidelines.

The liquid chromatography analysis was performed using an Accela chromatograph (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, a photodiode array detector (PDA) and a thermostated autosampler. Chromatographic separation was accomplished with an Atlantis T3C₁₈ column (100 \times 2.1 mm, 3 μm) from Waters (Milford, MA, USA) maintained at 25 °C. Gradient elution of analytes was carried out with H₂O (A) and acetonitrile (B), with 0.1% formic acid in both solvents at a constant flow rate of 0.350 mL/min, and the injection volume was 5 μL . An increasing linear gradient of solvent B (v/v) was used (t (min), %B) as follows: (0, 10); (1, 10); (15, 30); (22, 50); (28, 100); (34, 100), (36, 10) and the column was equilibrated for 6 min to initial

Table 1
The declustering potential (DP), focusing potential (FP), collision energy (CE) and entrance potential (EP) settings for the phenolic compounds [from Ref. [3]].

Compound	RT (min)	MS/MS	DP (V)	FP (V)	CE (V)	EP (V)	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Naringenin ^a	5.22	271 → 151	-50	-190	-30	-11	2.99×10^{-4}	9.99×10^{-4}
NAR-GLU ^a	4.20	447 → 271	-50	-190	-30	-11	2.51×10^{-4}	8.37×10^{-4}
NAR-SULF	7.14	351 → 271	-50	-190	-30	-11	-	-
3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid ^a	2.97	165 → 121	-30	-200	-20	-10	0.0338	0.1128
4-Hydroxyhippuric acid	1.45	194 → 100	-40	-200	-20	-10	-	-
3-Phenyl propionic acid ^a	4.78	149 → 105	-30	-200	-20	-10	0.4400	14.900
Hippuric acid ^a	2.66	178 → 134	-40	-170	-20	-10	0.0014	0.0049
(4-Hydroxyphenyl) acetic acid ^a	3.03	151 → 107	-40	-200	-20	-10	0.0045	0.0151

RT—retention time; LOD—limit of detection; LOQ—limit of quantification.

^a Identified with standard.

Table 2
Naringenin and naringenin metabolites identified in stomach and colon perfusion samples using LTQ-Orbitrap.

Compound	RT (min)	Accurate mass [$M-H^-$]	MS/MS ions (%intensities)	Error (mDa)	Molecular formula
Naringenin	28.12	271.0611	151.0033(100)/177.0188(20)	0.3	$C_{15}H_{12}O_5$
Naringenin-4,7-glucuronide	28.9	447.0933	271.0606(100)/175.0244(20)	1.6	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Naringenin-sulfate	28.18	351.018	351.0316(5)/271.0603(100)	0	$C_{15}H_{12}O_8S$
3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid ^a	15.12	165.0557	-	0.1	$C_9H_{10}O_3$
4-Hydroxyhippuric acid	28.72	194.0458	194.0817(20)/164.0816(55)	0.3	$C_9H_9NO_4$
Phloroglucinol ^a	21.7	125.0244	-	0.3	$C_6H_6O_3$
Apigenin ^a	28.52	269.0611	-	0.1	$C_{15}H_{10}O_5$
Monooxidated naringenin ^a	27.37	287.056	-	0.4	$C_{15}H_{12}O_6$
3-Phenylpropionic acid ^a	20.5	149.0607	-	0.4	$C_9H_{10}O_2$
(4-Hydroxyphenyl) acetic acid ^a	12.63	152.1481	-	1.1	$C_8H_8O_3$
Hippuric acid	15.61	178.0509	178.9773(10)/134.9876(100)	0.1	$C_9H_9NO_3$
Reduction of NAR	26.13	273.0768	179.0227(20)/153.0071(100)	0.1	$C_{15}H_{14}O_5$

^a No fragmentation appeared probably due to its low concentration.

Table 3
Mean percentage (%) \pm standard deviation (SD) of NAR metabolites found in stomach and colon perfusion samples using LC-ESI-MS/MS [from Ref. [3]].

	Stomach		Colon	
	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD
NAR-GLU	0.032 [*]	0.006	0.15	0.04
NAR-SULF	0.007 [*]	0.004	3.66	1.75
Hippuric acid	ND	ND	0.61	0.03
4-Hydroxyhippuric acid	ND	ND	0.55	0.02

ND—not detected.

^{*} $P < 0.05$ with colon (Mann–Whitney U -test).

conditions. These conditions were optimized following a method described by Vallverdú-Queralt et al. [21].

2.4. LC-ESI-MS/MS

Quantification of the previously identified compounds was performed by LC-ESI-MS/MS. A detailed description of the instrument and settings is presented elsewhere [3] and some of them are summarized in Table 1. The calibration curves prepared in PBS pH 2 and/or pH 7.2 were linear over the concentration ranges $0.003 \mu\text{g}/\text{mL}$ to $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($r > 0.998$) for NAR and its metabolites. There were no commercial standards available for 4-hydroxyhippuric acid and naringenin sulfate (NAR-SULF), so standards of a similar structure were used for quantification, namely, hippuric acid and unconjugated NAR, respectively.

2.5. Data analysis

In perfusate (lumen) at 60 min the percentage of each metabolite with respect to the inlet NAR perfusion solution (C_{in}) was calculated according to the following expression:

$$\%C_{met} = \frac{(C_{met} \times 100)}{C_{in}}$$

where C_{met} is the concentration of each metabolite in the sample.

The percentage of NAR-GLU and NAR-SULF in the stomach and colon lumen samples at 60 min was compared using the Mann–Whitney U -test, after rejecting their normal distribution (Kurtosis normality of residuals) and the homogeneity of variance (modified-Levene equal-variance test) (Table 3).

The level of significance was 5% ($P < 0.05$) and NCSS97 statistical software was used.

3. Results and discussion

In this work, we initially tested for the presence of NAR metabolites using LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS in FTMS mode followed by a data-dependent scan. The data-dependent scan proved very useful for the identification of unknown compounds, since it provides high resolution and accurate mass product ion spectra for unknown precursor ions within a single run. Combining the FTMS scan and MSⁿ experiments, 12 compounds were tentatively identified in stomach and colon perfusion samples, including enterocytic, hepatic and microbial metabolites. Table 2 enumerates the NAR metabolites identified in the perfusion samples by LTQ-Orbitrap-MS, along with retention times (RT), accurate mass, MS/MS ions (%intensities) used for the identification, mDa of error between the mass found and the accurate mass of each polyphenol and the molecular formula. Compounds were quantified by LC-ESI-MS/MS to determine the extent of NAR metabolism in both gastrointestinal sections.

Fig. 1 shows a metabolic pathway tentatively proposed for NAR metabolism in the stomach and colon. Results of the quantitative analysis by LC-ESI-MS/MS are summarized in Table 3. The statistically significant differences ($P < 0.05$) between each stomach and colon metabolite are highlighted.

3.1. Naringenin aglycone

LTQ-Orbitrap-MS analysis confirmed the presence of NAR (m/z 271.0611) with errors below 0.3 mDa. The MS² mass spectrum of

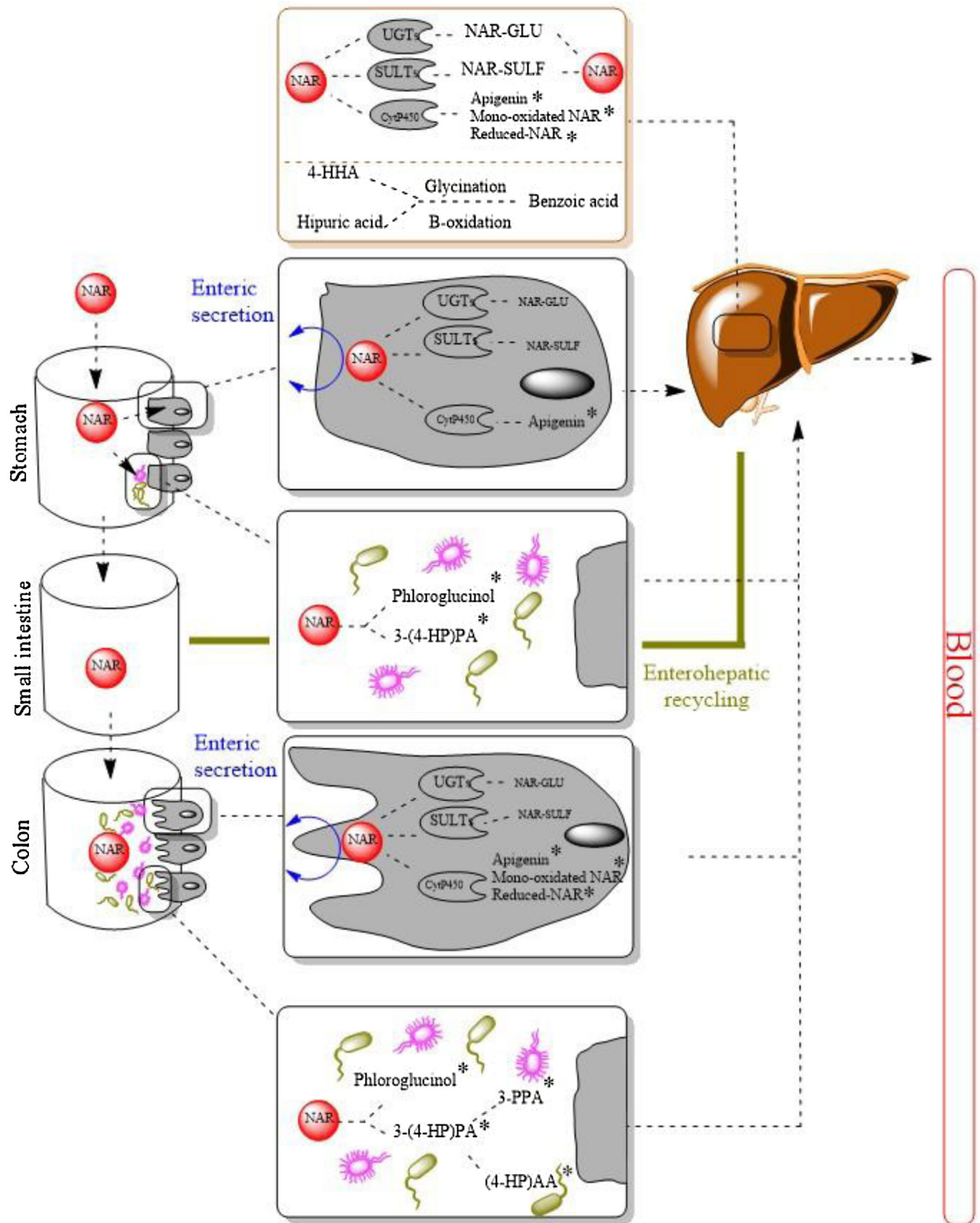


Fig. 1. Metabolic pathway tentatively proposed for the metabolism of naringenin in stomach and colon. *NAR metabolites identified only by LTQ-Orbitrap. 3-(4-HP)PA: 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid; 3-PPA: 3-phenylpropionic acid; (4-HP)AA: (4-hydroxyphenyl) acetic acid; 4-HHA: 4-hydroxyhippuric acid; UGTs: glucotransferases; SULTs; sulfotransferases.



Fig. 2. MS² spectra of naringenin (A) and naringenin-sulfate (B). Naringenin-7-*O*-sulfate would correspond to R1 = OH and R2 = SO₃H and naringenin-4-*O*-sulfate to R1 = SO₃H and R2 = OH.

m/z 271.06 showed peaks at 177.0188 and 151.0033, corresponding to the loss of 4-hydroxyphenylethane and phenol formed through the Retro Diels Alder (RDA) fragmentation in the C-ring, involving 1,3-scission [M-H-120]⁻ and [M-H-94]⁻, respectively (Fig. 2.A). In addition, NAR was identified in the triple quadrupole system in

MRM mode by the precursor/product ion pair *m/z* 271/151, and a linear calibration curve was obtained in the range of 0.003 μg/mL to 4 μg/mL, in order to obtain the exact concentration of the parent compound in perfusion samples at the beginning of the assays.

The average percentage of NAR at 60 min in perfusion samples was $23.69\% \pm 5.54\%$ in the stomach, and $11.18\% \pm 1.46\%$ in the colon [3].

3.2. Naringenin metabolites

3.2.1. Phase I metabolism

Phase I metabolism is produced mainly by the cytochrome P450 (CYP) enzyme system. CYP3A4 and 3A5 are the major CYP isoforms in the liver and intestinal tract, and play a prominent role in the metabolism of flavonoids [27]. Although CYP isoform expression is highest in the small intestine and lowest in the stomach, CYP 3A4, CYP3A5, CYP3A7 [28] and CYP2E1 [29] were quantified in the stomach.

At least two CYP oxidation products were identified using LTQ-Orbitrap-MS. The presence of apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavanone), formed by desaturation of the C-ring of NAR and detected at m/z 269.0611, was confirmed by LTQ-Orbitrap-MS in FTMS mode with an error below 0.1 mDa. The other compound was a mono-oxygenated metabolite, identified by LTQ-Orbitrap-MS in FTMS mode, showing an m/z 287.0560 peak with an error of 0.4 mDa. However, ion fragments of these two CYP products were absent in the data-dependent scan, probably due to its low concentration. Although, it was not possible to confirm the chemical structure of the mono-oxygenated metabolite, according to Nikolic and Van Breemen [30], it could be tentatively identified as a 3'-hydroxylated analog, eriodictiol, and/or aromadendrin or hydroxy quinone, depending on the hydroxylation site. Due to their low concentration in perfusion samples, CYP metabolism products could not be detected using the triple quadrupole system, due to its limited sensitivity, even in MRM mode.

Reduction of the NAR C-4 carbonyl group yielded a metabolite tentatively identified as 4, 5, 7, 4'-tetrahydroxyflavan (m/z 273.0768). The chromatograms in FTMS mode confirmed its presence with an error below 0.1 mDa. The product ion spectra showed peaks at 179.0227 and 153.0071, corresponding to the ions formed through the RDA fragmentation in the C-ring involving 1,3-scission [M-H-94]- and [M-H-120]-, respectively.

The use of LTQ-Orbitrap-MS enabled us to identify phase I metabolites in perfusion samples, which could not be achieved by LC-ESI-MS/MS due to their low concentrations. Apigenin was found in the stomach, confirming that NAR undergoes phase I metabolism in this gastrointestinal region. Colon phase I metabolism was also confirmed thanks to the identification of apigenin, one mono-oxygenated metabolite and the reduction product in perfusion samples.

3.2.2. Phase II metabolism

3.2.2.1. Glucuronides and sulfates. LTQ-Orbitrap analysis in the FTMS mode confirmed the presence of NAR-GLU (m/z 447.0933) with errors below 1.6 mDa. The MS² mass spectrum of m/z 447.0933 showed peaks at m/z 271.0606 and 175.0244, corresponding to the loss of 176u (glucuronide acid) and 271u (glucuronide acid ion), respectively, in both stomach and colon samples. The chromatogram in MRM mode obtained in the triple quadrupole system using a neutral loss scan of 176u also revealed the presence of NAR-GLU, giving a deprotonated molecule at m/z 271 corresponding to NAR. The quantification of NAR-GLU by LC-ESI-MS/MS showed a lower percentage in stomach than in colon samples (Table 3). These results agree with a higher glucuronosyltransferase activity in colonic than in gastric epithelia [31], together with a participation of colonic microbiota in the glucuronidation process [32].

Regarding sulfated metabolites, LTQ-Orbitrap-MS in FTMS mode identified NAR-SULF, showing an ion at m/z 351.018 with an error below 0.01 mDa. An MS² mass spectrum of 351.018 showed

peaks at 351.0316 and 271.0603, corresponding to the deprotonated NAR-SULF and the loss of SO_2H^- [M-H-96]-, respectively (Fig. 2.A). NAR-SULF metabolites were also identified with the triple quadrupole system; the chromatogram in MRM mode presented the precursor/product ion pair at m/z 351/271. As expected, NAR-SULF was identified in both stomach and colon samples, in agreement with Chen et al. [12], who found low sulfotransferase activity, responsible for NAR sulfation, in both stomach and colon. The highest percentage was obtained in colon samples (Table 3), in agreement with Gregory et al. [33], who found a lower sulfotransferase expression in the stomach than the colon.

3.2.2.2. Methylated and glutathionyl conjugated compounds. Injection of colon and stomach samples into the high-resolution system (LTQ-Orbitrap-MS) using accurate mass measurement confirmed the absence of a peak at m/z 301.0790 corresponding to the methylated metabolite of NAR. This is in concordance with the studies carried out by Felgines et al. [9], where no methylated NAR was observed, due to the lack of a catechol group in the NAR structure. Nor was there a peak at m/z 557.1371 corresponding to the glutathionyl conjugated compound, also probably because of the absence of a catechol group in its structure. This interpretation is based on the conjugation pathway of quercetin (a flavonoid with a similar structure to NAR but bearing a catechol group), where the glutathionyl conjugated compound arises from the oxidated product (*o*-semiquinone and *o*-quinone) [34]. More studies should be performed to confirm this hypothesis.

3.2.3. Microbial metabolism

Phloroglucinol and 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid are the first microbial metabolic products produced after the split of the carbonyl moiety. Phloroglucinol (m/z 125.0244) was identified in the FTMS chromatogram with errors of 0.3 mDa, but the data-dependent scan of m/z 125.0244 did not show any ion, probably due to the high resistance of the hydroxylated phenol to breakdown, or also because of its low concentration. Phloroglucinol is hardly ever recovered as a final metabolite as it can be degraded into acetate, butyrate and CO_2 [35]. On the other hand, another peak was identified in the FTMS mass spectrum corresponding to 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (m/z 165.0557), confirmed by exact mass measurements with an error of 0.1 mDa. The higher sensitivity of the LTQ-Orbitrap-MS system compared with the triple quadrupole enabled the identification of phloroglucinol and 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid in stomach and colon perfusion samples, which could not be detected by the latter method. The presence of phloroglucinol and 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid in stomach samples support the existence of microorganisms in the stomach environment and their participation in NAR metabolism.

These metabolites may be further transformed by microbiota to 3-phenylpropionic acid and (4-hydroxyphenyl) acetic acid. Examination of the chromatograms obtained by the LTQ-Orbitrap-MS in FTMS mode using accurate mass measurements revealed the presence of peaks at m/z 149.0607 (error of 0.4 mDa) and m/z 152.1481 (error of 1.1 mDa), corresponding to 3-phenylpropionic acid and (4-hydroxyphenyl) acetic acid, respectively. Neither metabolite was identified in the stomach samples using both techniques, but as expected they were found in the colon.

In addition, 3-phenyl propionic acid may also be subjected to β -oxidation and glycination in the liver, yielding hippuric acid (m/z 178.0509) and 4-hydroxyhippuric acid (m/z 194.0458) [35,36], both of which were detected in colon perfusion samples with the LTQ-Orbitrap in FTMS mode, using accurate mass measurement with errors of 0.3 mDa and 0.1 mDa, respectively. An MS² mass spectrum of m/z 194.0458 gave a product ion corre-

sponding to the loss of $[M-H-94]^-$ coincident with the phenol ion, m/z 100.0458, while the MS^2 spectrum of 178.0509 exhibited a fragment at m/z 134.9876, corresponding to the loss of formamide. The presence of these metabolites in the colonic perfusates under our experimental conditions (tied bile duct) could be explained by intestinal secretion. Hippuric acid can also be derived from aromatic amino acids, but the relatively high level obtained may be associated with the dose of NAR administered [2]. None of these metabolites were found in the stomach. Using the triple quadrupole system, 4-hydroxyhippuric acid and hippuric acid were identified and quantified in colon samples, with the chromatogram in MRM mode for the precursor/product ion (Table 3).

4. Conclusions

The experiments carried out in the present study have provided new data about the metabolism of NAR during its transit through the stomach and colon. The combination of two analytical techniques, LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS and LC-ESI-MS/MS, enabled us to accurately identify and/or quantify NAR and eleven of its metabolites.

To the best of our knowledge, this is the first in-depth metabolic profiling study of NAR in mouse stomach. The ability of LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS to identify compounds at very low concentrations such as: apigenin, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid and phloroglucinol, made it possible and evidence the presence of microorganisms responsible of this metabolism. The triple quadrupole system failed to identify them. Identification and quantification of NAR-GLU and NAR-SULF, using both analytical techniques, highlighted the role of intracellular metabolism of NAR.

The number of metabolites in the colon identified by the LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS was more than twice that identified using LC-ESI-MS/MS: apigenin, a mono-oxygenated product and the reduction product formed by CYP were identified thanks to the high sensitivity of the LTQ-Orbitrap, as were the phenolic metabolites produced by colonic microbiota: phloroglucinol, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, 3-phenylpropionic acid and (4-hydroxyphenyl) acetic acid. Only those metabolites present in a higher concentration, such as NAR-GLU, NAR-SULF, hippuric acid and 4-hydroxyhippuric acid, could be identified and quantified using LC-ESI-MS/MS and therefore also using the LTQ-Orbitrap.

Our results confirm that the combination of both analytical techniques can provide a broader metabolic profile of NAR after its oral ingestion, and therefore shed new light onto which metabolites may be responsible for the biological effects attributed to NAR.

Acknowledgements

This work was supported in part by CICYT (AGL2010-22319-C03; AGL2013-49083-C3-1-R) and the Instituto de Salud Carlos III, ISCIII (CIBEROBN) from the Ministerio de Economía y Competitividad and Generalitat de Catalunya (GC) 2014 SGR 773. The authors thank Ms. Lucy Brzoska for linguistic assistance.

References

- [1] H. Xu, K.H. Kulkarni, R. Singh, Z. Yang, S.W.J. Wang, V.H. Tam, M. Hu, Disposition of naringenin via glucuronization pathway is affected by compensating efflux transporters of hydrophilic glucuronides, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1703–1715.
- [2] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747.
- [3] N. Orrego-Lagarón, M. Martínez-Huélamo, A. Vallverdú-Queralt, R.M. Lamuela-Raventós, E. Escobedo-Ferrer, High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism, *Br. J. Nutr.* 114 (2015) 169–180.
- [4] A. Serra, A. Macia, M.P. Romero, J. Reguant, N. Ortega, M.J. Motilva, Metabolic pathway of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavonones) and phenolic acids, *Food Chem.* 130 (2012) 383–393.
- [5] M.V. Selma, J.C. Espín, F. Tomás-Barberán, Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6485–6501.
- [6] R. Choudhury, G. Chowrimootoo, K. Srail, E. Debnam, C. Rice-Evans, Interactions of the flavonoid naringenin in the gastrointestinal tract and the influence of glycosylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265 (1999) 410–415.
- [7] J.H. Lin, M. Chiba, T. Baillie, Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 135–158.
- [8] A. Scalbert, C. Morand, C. Manach, C. Rémésy, Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 276–282.
- [9] C. Felgines, O. Texier, C. Morand, C. Manach, A. Scalbert, F. Régerat, C. Rémésy, Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 (2000) G1148–G1154.
- [10] A.M. Aura, Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 407–429.
- [11] C.P. Strassburg, N. Nguyen, M.P. Manns, R.H. Tukey, UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon, *Gastroenterology* 116 (1999) 149–160.
- [12] G. Chen, D. Zhang, N. Jing, S. Yin, C.N. Falany, A. Radominska-Pandya, Human gastrointestinal sulfotransferases: identification and distribution, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187 (2003) 186–197.
- [13] Z.K. Wang, Y.S. Yang, Upper gastrointestinal microbiota and digestive diseases, *World J. Gastroenterol.* 19 (2013) 1541–1550.
- [14] E.M. Bik, P.B. Eckburg, S.R. Gill, K.E. Nelson, E.A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M.J. Blaser, D.A. Relman, Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 732–737.
- [15] Z. Zhao, Y. Egashira, H. Sanada, Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver, *J. Nutr.* 134 (2004) 3083–3088.
- [16] V. Crespy, C. Morand, C. Besson, C. Manach, C. Demigne, C. Rémésy, Quercetin but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 618–621.
- [17] M. Larrosa, C. Luceri, E. Vivoli, C. Pagliuca, M. Lodovici, G. Moneti, P. Dolara, Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 1044–1054.
- [18] M. Monagas, M. Urpi-Sarda, F. Sánchez-Patán, R. Llorach, I. Garrido, C. Gómez-Cordovés, C. Andres-Lacueva, B. Bartolomé, Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites, *Food Funct.* 1 (2010) 233–253.
- [19] M. Martínez-Huélamo, S. Tulipani, X. Torrado, Validation of a new LC-MS/MS method for the detection and quantification of phenolic metabolites from tomato sauce in biological samples, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4542–4549.
- [20] D. De Paepe, K. Servaes, B. Noten, L. Diels, M. De Loose, B. Van Droogenbroeck, S. Voorspoels, An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits, *Food Chem.* 136 (2013) 368–375.
- [21] A. Vallverdú-Queralt, J. Regueiro, M. Martínez-Huélamo, J.F. Rinaldi Alvarenga, L.N. Leal, R.M. Lamuela-Raventós, A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay, *Food Chem.* 154 (2014) 299–307.
- [22] J. Regueiro, C. Sánchez-González, A. Vallverdú-Queralt, J. Simal-Gándara, R. Lamuela-Raventós, M. Izquierdo-Pulido, Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry, *Food Chem.* 152 (2014) 340–348.
- [23] P. Quifer-Rada, A. Vallverdú-Queralt, M. Martínez-Huélamo, G. Chiva-Blanch, O. Jáuregui, R. Estruch, R. Lamuela-Raventós, Comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS), *Food Chem.* 169 (2015) 336–343.
- [24] A. Vallverdú-Queralt, O. Jáuregui, A. Medina-Remón, R.M. Lamuela-Raventós, Evaluation of a method to characterize the phenolic profile of organic and conventional tomatoes, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 3373–3380.
- [25] H. Wu, J. Guo, S. Chen, X. Liu, Y. Zhou, X. Zhang, X. Xu, Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72 (2013) 267–291.
- [26] E. Escobedo, X.G. Sala, J. Salamanca, C.R. Navarro, J.Q. Regué, Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse, *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 472–477.
- [27] S. Egert, G. Rimbach, Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Adv. Nutr.* 2 (2011) 8–14.
- [28] R. Canaparo, N. Finnström, L. Serpe, A. Nordmark, E. Muntoni, M. Eandi, A. Rane, G.P. Zara, Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (2007) 1138–1144.
- [29] M.N.F. S. Innstrom, A. Lundgren, L.L. Rane, Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 60 (2005) 54–60.
- [30] D. Nikolic, R.B. Van Breemen, New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 32 (2004) 387–397.

- [31] J.M. Little, L. Williams, J. Xu, A. Radominiska-Pandya, Glucuronidation of the dietary fatty acids, phytanic acid and docosahexaenoic acid, by human UDP-glucuronosyltransferases, *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 531–533.
- [32] C. Marvalin, R. Azerad, Microbial glucuronidation of polyphenols, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 73 (2011) 43–52.
- [33] P. Gregory, R.H. Lewinsky, D. Gardner-Stephen, P.I. Mackenzie, Regulation of UDP glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199 (2004) 354–363.
- [34] H. Paulikova, E. Berczeliova, The effect of quercetin and galangin on glutathione reductase, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov. Repub.* 149 (2005) 497–500.
- [35] S. Possimiers, S. Bolca, W. Verstraete, A. Heyerick, The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals, *Fitoterapia* 82 (2011) 53–66.
- [36] A.R. Rechner, M.A. Smith, G. Kuhnle, G.R. Gibson, E.S. Debnam, S. Kaila, S. Srivastava, K.P. Moore, C.A. Rice-Evan, Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 212–225.

Publicación 3.

Orrego-Lagarón, Naiara, Martínez-Huélamo, Miriam, Quifer-Rada, Paola; Lamuela-Raventos, Rosa María & Escribano-Ferrer, Elvira. *Absorption and disposition of naringenin and quercetin after simultaneous administration in intestinal perfusion in mice*. Enviado al *Food and Function*.

Resumen: El consumo de hortalizas y en particular del tomate, ha aumentado considerablemente debido a la actual tendencia de consumir dietas más saludables. Esta hortaliza contiene gran cantidad de flavonoides entre los que destacan por su alta concentración, la naringenina y la quercetina. Ambos han demostrado tener actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticarcinogénica, a pesar de su baja biodisponibilidad oral (10% y 0.004-0.1%, para la naringenina y la quercetina, respectivamente) (Xu *et al.* 2009; Boonpawa *et al.* 2014). Por este motivo, el estudio de dichos flavonoides ha despertado un gran interés tanto en la promoción de dietas saludables como en el desarrollo de suplementos nutricionales. Dado que ambos polifenoles son frecuentemente administrados dentro de una misma matriz (alimento), éstos pueden interactuar entre ellos provocando cambios en su metabolismo y/o permeabilidad, pudiendo repercutir en su biodisponibilidad. Por otro lado, dado el elevado efecto de primer paso intestinal observado para la naringenina dando lugar principalmente a sulfato-conjugados, la coadministración de quercetina (inhibidor de las SULFs e inductora de las UGTs) podría interferir en el metabolismo de la naringenina aumentando su biodisponibilidad.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, el presente estudio tiene como objetivos estudiar la influencia en la permeabilidad y el metabolismo de la administración conjunta de ambos compuestos, naringenina y quercetina, a dosis reales (3.5 µg/mL y 2.36 µg/mL, respectivamente), respecto a su administración separada. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de perfusión en intestino delgado *in situ* en ratón en administración conjunta o separada, en los que se tomaron muestras de la solución de perfusión cada 10 min y de sangre y bilis al finalizar el ensayo (60 min). Las muestras fueron analizadas por UHPLC-MS/MS para evaluar y cuantificar la presencia de los compuestos y sus metabolitos. Los resultados mostraron que cuando se administraban solos ambos tenían una permeabilidad alta ($7.71 \pm 0.82 \cdot 10^{-4}$ cm/s para la naringenina y $7.30 \pm 1.95 \cdot 10^{-4}$ cm/s para la quercetina), mientras que en administración conjunta la permeabilidad de ambos disminuyó ($4.09 \pm 0.89 \cdot 10^{-4}$ cm/s para la naringenina y $3.18 \pm 0.45 \cdot 10^{-4}$ cm/s para la quercetina). Respecto al metabolismo, se observó un aumento del número de metabolitos de fase II para ambos compuestos cuando se administraban conjuntamente. Se observó también un aumento de la excreción biliar de estos metabolitos, indicando que la coadministración de los dos polifenoles favorece la recirculación entero-

.. Resultados.....

hepática, aumentando por tanto el tiempo de residencia de los compuestos y de sus metabolitos en el organismo.

Este estudio ha permitido profundizar en los mecanismos implicados en la absorción y el metabolismo de la naringenina y de la quercetina y su posible interacción. Dicho conocimiento a su vez puede ayudar en la prevención de interacciones entre componentes de la dieta, suplementos nutricionales y/o fármacos, que utilicen los mismos mecanismos de absorción y/o metabolismo.

Absorption and disposition of naringenin and quercetin after simultaneous administration in intestinal perfusion in mice

Naiara Orrego-Lagarón¹, Miriam Martínez-Huélamo^{2,3}, Paola Quifer-Rada^{2,3}, Rosa M. Lamuela-Raventos^{2,3}, Elvira Escribano-Ferrer^{1,2*}

¹Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Institut of Nanoscience and Nanotechnology (IN₂UB). University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain.

²CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) Instituto de Salud Carlos III, E-28029 Madrid, Spain.

³Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA. Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain.

* Corresponding author:

Elvira Escribano-Ferrer

Pharmacy and Pharmaceutical Technology Dpt.

Faculty of Pharmacy

University of Barcelona

Av. Joan XXIII s/n

08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 9340 24578

Email: eescribano@ub.edu

Abstract

The purpose of the present work was to study how co-administration of naringenin and quercetin at realistic doses (3.5 µg/ml and 2.36 µg/ml, respectively) might effect their absorption and intestinal first-pass metabolism. A single-pass intestinal perfusion model in mice (n=4-6) was used. Perfusate (every 10 minutes), blood (at 60 min) and bile samples were analysed by an UPLC-ESI-MS/MS method to evaluate the presence of naringenin and quercetin and their metabolites. Both naringenin and quercetin showed high permeability coefficients when administered separately ($7.71 \pm 0.82 \cdot 10^{-4}$ cm/s vs. $7.30 \pm 1.95 \cdot 10^{-4}$ cm/s, respectively), but these values decreased by 50% with co-administration ($4.09 \pm 0.89 \cdot 10^{-4}$ cm/s for naringenin and $3.18 \pm 0.45 \cdot 10^{-4}$ cm/s for quercetin). Moreover, the level of phase II metabolites in perfusion, plasma and bile samples increased when naringenin and quercetin were administered together. The higher biliary excretion of these metabolites showed that co-administration favoured entero-hepatic recycling, thereby increasing the residence time of the aglycons and metabolites in the organism. The results of this study may be helpful in the prevention of undesired interactions between polyphenols and polyphenols/drugs that use the same mechanism of absorption and elimination.

Keywords: Naringenin, quercetin, co-administration, intestinal perfusion, metabolism, permeability, mice.

1. Introduction

The growing trend for promoting healthy eating patterns, such as the Mediterranean diet, has resulted in a high increase in the consumption of vegetables, including tomatoes.¹ Tomatoes contain high amounts of flavonoids (polyphenol compounds produced by plant secondary metabolism), particularly quercetin and naringenin (Fig. 1), which have been identified as major antioxidants.¹ Many health-promoting properties have been reported for both flavonoids: quercetin exhibits antioxidative, anticarcinogenic, anti-inflammatory, and anti-aggregatory vasodilating effects²⁻⁴, and naringenin presents antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activity, as well as the capacity to diminish blood lipids and cholesterol after oral administration.⁵

Given their biological activities, the study of the target flavonoids is of great interest for health promotion and also for the rational development of oral dosage forms for dietary supplements. Their benefits for human health are assumed to be related with their bioavailability, but studies have shown this to be low for both flavonoids: 10% for naringenin⁵ and 0.004-0.1% (predicted value)⁶ or 0.3% in the pig⁷ for quercetin after oral ingestion. In addition to the permeability of the compound, bioavailability also depends on how extensive is the intestinal and hepatic metabolism. Solubility in aqueous media in physiological fluids is another potential limiting factor for the rate and extent of absorption.⁸ However, regardless of their intrinsic physicochemical and biopharmaceutical properties, interactions between actives⁹, actives and pharmaceutical ingredients¹⁰, actives and metabolites¹¹ and/or actives with the food matrix¹² can also affect the bioavailability of the ingested compounds due to changes in their solubility, permeability and/or metabolism.

Recently, we have studied the permeability and disposition of naringenin in mice¹³ and the permeability of quercetin and other flavonoids in Caco-2 cells has been reported^{14,15}. According to these studies, the permeability of naringenin and quercetin across the intestinal membrane is mainly due to a passive diffusion mechanism favoured by their physico-chemical properties (Table 1,^{16,17}), but other mechanisms involving membrane transport proteins have been described for both compounds¹⁴ (Table 2). Intestinal and hepatic metabolism also plays an important role in the bioavailability of naringenin and quercetin after their oral administration. In our previous study, high first-pass metabolism was observed for naringenin in mice (more intestinal than hepatic), with sulfate and glucuronide conjugates as the main metabolites. Quercetin also undergoes extensive metabolism to glucuronyl-, sulfo- and methyl-conjugates after its ingestion, as shown in human *in vivo*¹⁸ and *in vitro* studies¹⁹, and in rats.²⁰ It is also reported to induce glucuronosyltransferase activity.^{21,22}

As common constituents of tomatoes and other fruits and/or vegetables, naringenin and quercetin are usually ingested together, so for a clearer understanding of their bioavailability, metabolic fates and health benefits, it is more insightful to study them together. Thus, Krogholm²³ studied the relative bioavailability of quercetin, hesperetin and naringenin administered simultaneously in a "juice mix" (6.3 ml/kg b.w.) to healthy men; Silberberg²⁴ co-administered quercetin (0.25%) and catechin (0.25%) to rats, and Lund²⁵ examined how combinations of quercetin, resveratrol and curcumin (50 μ M) affected their *in vitro* permeability in Caco-2 monolayers. These studies and others²⁶⁻²⁸ show how the interaction between flavonoids in one or more of the ADME processes affects the bioavailability of ingested compounds.

However, to the best of our knowledge, studies on the association of naringenin and quercetin and its possible effect on their respective absorption and metabolism are lacking. The aim of this work was therefore to study if the co-administration of naringenin and quercetin at realistic doses alters their absorption and intestinal first-pass metabolism in comparison with separate administration, and therefore if their individual absorption, metabolism and bioavailability are affected.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Naringenin (NAR), quercetin (QUER), quercetin-3-O- β -D-glucuronide (QUER-GLU), phenol red, L-ascorbic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Naringenin-4-O-glucuronide (NAR-GLU) and naringenin-7-O-glucuronide (NAR-GLU) were obtained from the Cayman Chemical Company (Michigan, USA). Isorhamnetin (ISORH) was from Extrasynthese (Genay Cedex, France). Reagents for analysis, sodium chloride, sodium monohydrogen phosphate dehydrate, anhydrous disodium hydrogen phosphate, orthophosphoric acid and sodium hydroxide were provided by Panreac Química (Barcelona, Spain), and ethanol, methanol, acetonitrile and formic acid were purchased from Scharlau Chemie, S.A. (Barcelona, Spain).

2.2 Analytical methods

Samples were analysed by UPLC-ESI-MS/MS. The liquid chromatography was an ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Massachusetts, USA) equipped with a thermostated autosampler and a column oven set to 30 °C. This was coupled to an API 3000 triple-quadrupole mass spectrometer (PE Sciex) with a turbo ion spray source, which was used to identify and quantify the corresponding phenolic metabolites. Separation was achieved using a Waters BEH C18 column (50 \times 2.1 mm) packed with 1.7 μ m particles (Waters Corporation, Massachusetts, USA) using the following parameters: the mobile phase was H₂O (A) and acetonitrile (B), with 0.1% formic acid in both solvents. An increasing linear gradient (v/v) of B was used (t (min), %B), as follows: (0, 5); (2, 25); (6, 100); (2.65, 100); (6.5, 100); (7, 5) and (9, 5), at a constant flow rate of 0.6 ml/min, and the injection volume was 10 μ l. The turbo ion spray source was in negative mode with the following settings: capillary voltage, -4500 V; nebulizer gas (N₂), 10 (arbitrary units); curtain gas (N₂), 12 (arbitrary units); and drying gas (N₂) heated to 400 °C. The declustering potential (DP), focusing potential (FP), collision energy (CE) and entrance potential (EP) (table 3) were optimized to detect phenolic compounds with the highest signals. The system was controlled by Analyst v. 1.4.2 software supplied by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

NAR, QUER and their metabolites identified in the samples are shown in Table 3, together with their retention time (rt), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The calibration curves for stability and perfusion samples were prepared in a phosphate buffer at pH 6.2, and were linear over the concentration ranges 0.003 μ g/ml to 4 μ g/ml ($r > 0.998$) for NAR, QUER and their metabolites. For plasma and bile samples, the standards were prepared in water containing 0.1% (v/v) formic acid, as explained below. Aglycones and metabolites were quantified by taking into account the LOQ. No commercial standards were available for naringenin sulfate (NAR-SULF), naringenin-O-sulfo-O-glucuronide (NAR-O-SULF-O-GLU), quercetin sulfate (QUER-SULF), quercetin diglucuronide (QUER-diGLU), isorhamnetin

glucuronide (ISORH-GLU) and isorhamnetin sulphate (ISORH-SULF), so standards of similar structures were used for quantification: unconjugated NAR, QUER and ISORH, respectively.

The UPLC method was fully validated following the criteria of the AOAC with low LODs and LOQs, higher recoveries (>90%), and good accuracy and intra- and interday precision.

2.3 Isotonic phosphate buffer at pH 6.2

Three different isosmotic perfusion solutions at pH 6.2 were used: i) NAR (3.5 µg/ml), ii) QUER (2.36 µg/ml) and iii) both polyphenols together. The solutions also contained phenol red (0.1 mg/ml).²⁹ The concentrations of NAR and QUER were chosen based on their levels in raw tomato, and the daily ingestion of tomatoes in a Mediterranean diet (0.5 kg in raw tomato, tomato juice and tomato sauce) for a 70 kg person. The concentration of NAR was 3.5 µg/ml¹³ and in the case of QUER whose mean concentration in raw tomato is 9.1 mg/kg, a dose of 2.36 µg/ml was chosen.

2.4 Solubility and stability studies

The pH-solubility profiles of NAR and QUER were determined at 37°C ± 1°C in aqueous media at pH values of 1, 2, 5.5, 6.2 and 7.2. For the QUER assay, 20 µg/ml of ascorbic acid was added to the samples to avoid its oxidation during the solubility study. It should be noted that this addition did not have any effect on the solubility of the compound.³⁰ An aliquot of 500 µl was removed, filtered (0.45µm) and transferred to a new vial containing 50 µl of ethanol and 50 µl of H₂O with 10% (v/v) of formic acid. Finally, the concentration of NAR and/or QUER in each sample was determined by UPLC. Three replicates at each pH were carried out.

The stability of NAR (3.5 µg/ml) and QUER (2.36 µg/ml) in the perfusion solution at pH 6.2 was tested at 37 °C. As the solubility of QUER at pH 6.2 was lower than the concentration of the study, 0.05% (v/v) of DMSO was added to the samples to achieve the concentration of 2.36 µg/ml. Six aliquots of the solutions were incubated at 37 °C and samples were taken at 0, 1, 2 and 3 h. Then 50 µl of ethanol and 50 µl of H₂O with 10% of formic acid were added and the samples were stored at -80 °C until analysis.

2.5 Perfusion experiments

The studies were conducted following a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain (trial nr CEEA 219/12) and therefore have been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Authors have also been observed specific national laws.

Single-pass intestinal perfusion was performed in mice according to the method described by Orrego-Lagarón.¹³ Six animals fed with a polyphenol-free diet for one week were used for each compound. More information about the diet, anesthesia and surgical procedure is described in detail previously.

Briefly, the abdomen was opened and the biliary duct was tied. Then, the small intestine was cannulated (starting from the duodenum, about 10-15 cm length) and the experiment started by delivering the perfusion solution containing NAR, QUER or both polyphenols together to the tubes and intestinal segment at a flow rate of 0.20 ml/min. The outflow perfusate was collected in 1.5 ml amber eppendorfs at 10 min intervals for 60 min. Samples were centrifuged (7516.3 g for 10 min at 4 °C) (Centrifuge 5415R, Hamburg, Germany) and 650 µl aliquots of the

.. Resultados

supernatant were spiked with 50 µl of ethanol and 50µl of H₂O with 10% of formic acid. Then samples were stored frozen (-80 °C) until analysis. At 60 min a blood sample was obtained via cardiac puncture, the gallbladder was collected, and the length of the intestinal segment was measured. Bile samples from 4–6 mice were pooled and stored with all samples at -80 °C until analysis by UPLC-ESI-MS/MS.

2.6 Solid phase extraction of polyphenols from plasma and bile samples

On the day of analysis by UPLC-ESI-MS/MS, plasma and bile samples were defrosted and centrifuged (7516.3 g for 10 min at 4 °C). An exact volume of supernatants was transferred into an amber eppendorf and diluted to 1 ml with water containing 0.1% (v/v) formic acid. A solid phase extraction clean-up procedure was applied to plasma and bile samples following the method of Tulipani³¹ and presented elsewhere.¹³

2.7 Data analysis

Effective permeability coefficients (*P_{eff}*) were calculated from the steady-state concentrations of NAR or QUER in the collected perfusate, according to Eq. (1)³² after correcting the outlet concentration (Eq. 2) according to the phenol red method^{33,34}.

$$P_{eff} = \frac{-\phi_m \cdot L \cdot \ln \frac{C_{in}}{C_{out.cor}}}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L} \quad (1)$$

Where ϕ_m is the flow rate (0.20 ml/min), *C_{in}* and *C_{out.cor}* are the respective inlet and corrected outlet steady-state concentrations (Eq. 2), *R* is the radius of the mouse small intestine (0.1 cm)³⁵ and *L* is the length of gastrointestinal segment after completion of the perfusion experiment.

$$C_{out.cor} = C_{out} \times \frac{C_{PRin}}{C_{PRout}} \quad (2)$$

Where *C_{out}* is the concentration of NAR or QUER in the perfusate at the specified time interval, *C_{PRin}* is the phenol red concentration in the inlet buffer solution and *C_{PRout}* is the phenol red concentration at the specific time interval. The *P_{eff}* was determined in 4–6 mice at between four and six steady-state outlet concentrations, and expressed as mean ± standard deviation (SD).

The percentage of absorption (% abs) was calculated according to Eq. (3)³⁶ and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD).

$$\% \text{ abs} = \left[1 - \exp\left(-\frac{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L}{\phi_m} \cdot P_{eff}\right) \right] \cdot 100 \quad (3)$$

For the main phase II metabolites, a linear trapezoidal method was used to calculate the area under the lumen concentration curve AUC (normalized by the inlet perfusion concentration of NAR) from time zero until the last sample, using the WinNonlin® software version 5.3 (Pharsight, USA). AUC values were expressed in minutes.

Moreover, in perfusate at 60 min, plasma and bile samples, the percentage of each metabolite with respect to the inlet aglycon perfusion solution (C_{in}) was calculated according to Eq. (4):

$$\% C_{met} = (C_{met} * 100) / C_{in} \quad (4)$$

Where C_{met} is the concentration of each metabolite in the sample.

2.8 Statistical analysis

The estimated concentrations at a range of times in the stability study were compared using the parametric assay One-Way ANOVA.

The P_{eff} of NAR and QUER, percentages of absorption and percentage in plasma (Table 4) of single- and co-administered flavonoids in the small intestine were compared using the Kruskal-Wallis one-way Anova test on Ranks.

The same tests were applied for the comparison of the conjugated metabolites when the aglycones were assayed alone vs. co-administered (Tables 5 and 6).

In all cases, the level of significance was 5% (P<0.05) and NCSS97 statistical software was used.

3. Results

3.1 Solubility and stability studies

Figures 2 (a) and 2 (b) show the pH-solubility profile of NAR and QUER in the pH range studied. As can be observed, the solubility increased with the pH according to the acidic nature of the compounds, and ranged between 22.88 ± 0.60 µg/ml at pH 1 to 46.86 ± 0.38 µg/ml at pH 7.2 for NAR, and from 0.74 ± 0.02 µg/ml at pH 1 to 2.67 ± 0.04 µg/ml at pH 7.2 for QUER, a less soluble compound.

Figures 2 (c, d) show the stability results at pH 6.2. At 37 °C NAR (c) was stable for 2 h, while QUER was stable for 3 h (P= 0.7384).

3.2 Absorption and metabolism in single administration

3.2.1 Permeability coefficient and percentage of absorption

The mean permeability coefficients and absorption percentage for NAR and QUER in mice using an in situ single-pass perfusion technique are shown in Table 4. These results indicate higher intestinal absorption for NAR than for QUER expressed in terms of the permeability coefficient (7.71 ± 0.82·10⁻⁴ cm/s vs. 7.30 ± 1.95·10⁻⁴ cm/s, respectively), or percentage of absorption (94.82 ± 3.15 % vs. 85.02 ± 1.37 %, respectively). However, these differences were not significant.

3.2.2 Plasma and bile: percentages of the aglycones

Corresponding to the absorption results, the percentage of NAR quantified in plasma samples was somewhat higher than the percentage of QUER ($29.10 \pm 6.72\%$ vs. $24.86 \pm 1.96\%$, respectively). Neither aglycone was found in the bile samples (Table 4).

3.2.3 Phase II metabolism

The mean areas (\pm standard deviation) under the lumen concentration curve (AUC) from time zero until the last sample (60 min) of the NAR and QUER phase II metabolites are shown in Table 5. A higher number of metabolites were detected for QUER than NAR, and levels of sulfates were significantly higher than glucuronides (48.31 ± 7.17 vs. 4.07 ± 2.95 min, respectively, for NAR and 11.62 ± 1.19 vs. 0.75 ± 0.24 min, respectively, for QUER), suggesting an enhanced activity of the enteric sulfotransferases.

Plasma and bile samples showed a poor metabolic profile, especially when the aglycones were administered separately (Tables 6 and 7). Only NAR-GLU ($23.15 \pm 8.57\%$) was quantified in plasma and no metabolites were detected in the bile when NAR was administered alone. Similarly, no QUER metabolite was found in plasma, although ISORH-SULF and QUER-SULF (13.62% and 17.47% , respectively) were found in the bile.

3.3 Absorption and metabolism in co-administration

3.3.1 Changes in permeability

When NAR and QUER were administered simultaneously, their permeability coefficients showed a significant reduction (50%) (Table 4): from $7.71 \pm 0.82 \cdot 10^{-4}$ cm/s to $4.09 \pm 0.89 \cdot 10^{-4}$ cm/s for NAR and from $7.30 \pm 1.95 \cdot 10^{-4}$ cm/s to $3.18 \pm 0.45 \cdot 10^{-4}$ cm/s for QUER. The percentage of absorption also decreased, from $94.82 \pm 3.15\%$ to $74.04 \pm 6.57\%$ for NAR and from $85.02 \pm 1.37\%$ to $65.48 \pm 6.15\%$ for QUER, resulting in a reduced permeability in the co-administration.

3.3.2 Changes in aglycone levels in plasma and bile

NAR and QUER levels in plasma did not change significantly when administered together, although the percentage of QUER was lower ($16.39 \pm 3.97\%$ vs. $24.86 \pm 1.96\%$, respectively). In bile, the aglycones were only quantified when co-administered (Table 4).

3.3.3 Changes in phase II metabolism

In general, the phase II metabolites in perfusion samples increased when NAR and QUER were administered together (Table 5). As in the single administration, the main phase II metabolites of both compounds found in the intestinal lumen were sulfates, followed by glucuronides for NAR and ISORH-GLU for QUER. Plasma (Table 6) and bile samples (Table 7) also showed a higher percentage of metabolites after co-administration. In plasma, the main NAR and QUER metabolites were glucuronides, while sulfated aglycones were not found after either single or co-administration. When co-administered, NAR was more highly metabolized in the liver, with NAR-GLU (67.52%), NAR-SULF (34.22%), and the di-conjugated NAR-O-SULF-O-GLU (75.24%) found in the bile samples. Hepatic conjugation of QUER qualitatively and quantitatively increased after the co-administration: its glucuronide conjugates were only present when the aglycones were administered together. QUER-SULF levels were very high (higher than 100%) probably since the bile sample was pooled from 6 mice.

4 Discussion

4.1 Solubility and stability studies

NAR and QUER are poorly soluble compounds: the highest solubility value for NAR was $46.86 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ at pH 7.2 and 37°C , and $2.67 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ for QUER in the same media. In both cases, these solubilities were higher than the concentration of NAR and QUER in a daily ingestion of tomatoes for mice (2.5 ng/ml and 4.73 ng/ml , respectively) and are not expected to be a limiting factor in their absorption. However, for QUER, due to its low solubility at pH 6.2, it was necessary to add 0.05% DMSO to the perfusion solution in order to reach the assay concentration of $2.36 \mu\text{g/ml}$.

According to the stability results, NAR and QUER were stable in the assay concentrations at pH 6.2 and 37°C for the time required to perform the permeation experiments. Any subsequent decrease in the concentration of the aglycones in the perfusion solution at a steady state can thus be attributed to the absorption process.

4.2 Absorption and metabolism in single administration

4.2.1 Permeability coefficient and percentage of absorption

According to the obtained permeability coefficients and percentage of absorption, the intestinal absorption of NAR was higher than for QUER (Table 4). Chabane ¹⁴ also reported higher intestinal permeability for NAR vs. QUER in Caco-2 cells. NAR, despite being a substrate of P-gp protein, is a well-absorbed compound, similar to naproxen. ¹³ As the intestinal permeability coefficient of QUER is lower than for NAR or propranolol ³⁷, QUER could be considered as a moderate permeability compound.

Moreover, the transcellular absorption of both compounds is mainly by passive diffusion ^{14, 15, 37}, according to their physicochemical characteristics, such as low molecular weight and high lipophilicity (Table 1), and small structural differences (Fig. 1) do not seem to have any significant impact on the interaction with the intestinal membrane.

4.2.2 Plasma and bile: percentages of the aglycones

A higher percentage of NAR than QUER was observed in plasma at 60 min (Table 4), suggesting the former has a higher bioavailability. These results are similar to those obtained by Krogholm ²³, who reported a higher maximum plasma concentration and area under the curve (from 0 to 48 h) for NAR vs. QUER. after administering the same dose of each aglycone in a juice mix to ten healthy men.

4.2.3 Phase II metabolism

Phase II metabolites of both aglycones were present at higher levels in the intestinal lumen than in plasma and bile, and were predominantly sulfates (Table 5). In contrast, no NAR metabolites were quantified in the bile, only ISORH-SULF (13.62%) and QUER-SULF (17.47%). The lower hepatic metabolism observed is in agreement with Chen [38], who after intravenous and oral administration of QUER in rats observed 3.1% of hepatic metabolism and no significant entero-hepatic recirculation, vs. 93.3% of metabolism in the gut.

A higher number of conjugated metabolites were found for QUER than NAR, as in the aforementioned study of Krogholm ²³, in which QUER was excreted intact in urine far less than NAR, indicating that at similar permeabilities QUER was more metabolized, and the metabolites would be excreted by bile or urine.

4.3 Absorption and metabolism in co-administration

4.3.1 Changes in permeability

As explained before (section 3.3.1), the co-administration of NAR and QUER reduced their absorption. Similar results were obtained by Silberberg ²⁴, who observed a reduction in the absorption and lower plasma concentrations of QUER and catechin when they were supplied to rats simultaneously in the diet vs. when each was administered alone. The mechanisms involved in NAR and QUER crossing the intestinal membrane, according to Chabane ¹⁴ (Table 2), include binding to efflux and influx transporters, so this reduction in absorption may be due to interactions with transporters. Flavonoids are described not only as substrates of active efflux transporters, but also as their regulators. A biphasic effect on P-gp by QUER has been observed in different cell systems used in *in vitro* studies depending on its concentration ^{39,40}: at low concentrations (≈ 10 nM-100 nM) QUER activated the transport activity of P-gp, and inhibited it at high concentrations (≈ 1 μ M). In our *in vivo* study in mice, QUER at 6.6 μ M seemed to stimulate the P-gp-mediated efflux, thereby reducing the intestinal permeability of NAR. This hypothesis is also in agreement with the results reported by Mitsunaga ⁴¹, who described that low concentrations of QUER indirectly activated P-gp, leading to a higher intestinal efflux of NAR. Moreover, QUER is also involved in the modulation of MRP1 transporters at low doses. QUER inhibited MRP1 ATP-ase activity by 22 - 37% ²⁷, and as NAR is a substrate of MRP1, this could also contribute to the decrease in its absorption.

4.3.2 Changes in the aglycone levels in plasma and bile

When mice were perfused with both aglycones simultaneously, a decrease in the percentage of QUER was observed in plasma, while the percentage of NAR remained similar or even increased slightly, when a decrease would be expected according to the reduced absorption. A possible explanation is the inhibitory effect of QUER on the isoform CYP3A4, which is responsible for metabolizing NAR into apigenin and/or other monooxidation products ^{42,43}. Then the metabolism of NAR may be reduced by enzyme inhibition resulting in an increase in its plasma levels.

4.3.3 Changes in phase II metabolism

An increase in the amounts of phase II metabolites in the intestinal lumen, plasma and bile was observed when the aglycones were administered simultaneously vs. when given alone (Tables 5-7). In particular, the increase in glucuronides could be explained by an inducer effect of QUER on UGT-enzymes. Petri ²² observed an induction of UGT1A1 up to 2.6-fold in a human jejunum *in vivo* (Loc-I-Gut) when an onion and broccoli extract (containing 60 μ M QUER) was perfused. Similarly, Galijatovic ²⁶ showed a 2-fold increase of the glucuronidation pathway after quercetin pre-treatment in Caco-2 cells. In the case of sulfates, although QUER is described as an inhibitor of sulfotransferase activity ^{21, 44}, this effect was not observed in our study: NAR-SULF was not detected in plasma or bile, and in perfusion samples sulphate levels were higher when both aglycones were administered together (Table 5).

After phase II metabolism, the conjugates are excreted into the lumen and bile by efflux transporters such as P-gp, MRP2 and BCRP ⁵, thus QUER interaction with these transporters could be responsible for the higher levels of phase II metabolites in the lumen and bile after co-administration ³⁹. In particular, as explained above (section 3.3.1) the induction of P-gp by QUER at low concentrations could also explain the higher concentration of sulfo- and gluco-metabolites in bile and perfusion samples.

5. Conclusions

Naringenin and quercetin are usual components of the human diet and are regularly ingested in fruits, vegetables and plant-derived foods and beverages. Due to the health benefits attributed to these aglycones, it is important to know the mechanisms involved in their absorption, metabolism and elimination in our organism after ingestion. In this work, we have studied the absorption and disposition of naringenin and quercetin at realistic doses in mice using a single-pass intestinal perfusion. Both aglycones were well-absorbed, but naringenin showed higher intestinal permeability than quercetin and lower first-pass metabolism. For both compounds, first-pass metabolism was higher in the intestine than the liver. As naringenin and quercetin are usually ingested together in foods, it is of great interest to study how the presence of one affects the absorption and/or disposition of the other. The co-administration of naringenin and quercetin led to a decrease in their absorption, and an increase in phase II metabolism. Sulfated, glucuronide and methylated (for quercetin) compounds were the main metabolites produced and they were excreted in the intestinal lumen and the bile. The enhanced biliary excretion of the conjugates after simultaneous administration favoured entero-hepatic recycling, which would extend their residence time in the organism. Thus, the simultaneous administration of these two flavonoids alters the bioavailability and enterohepatic recycling of the individual compounds.

Knowledge of the mechanism involved in the absorption and disposition of naringenin and quercetin can also help prevent or avoid some interactions between drugs and components of the diet, leading to safer and more effective treatments.

6. Acknowledgments

This work was supported in part by CICYT (AGL2010-22319-C03, AGL2013-49083-C3-1-R) and the Instituto de Salud Carlos III, ISCIII (CIBEROBN) from the Ministerio de Economía y Competitividad and Generalitat de Catalunya (GC) 2014 SGR 773. The authors thank Ms. Lucy Brzoska for linguistic assistance.

7. References

1. J.K Willcox, GL Catignani GL, S.Lazarus, Tomatoes and cardiovascular health, Crit Rev Food Sci Nutr., 2003, **43**, 1–18.
2. AW Boots, GRM.M, Haenen, A Bast, Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical, Eur J Pharmacol., 2008, **585**, 325–337.
3. I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, Nutr Res., 2004, **24**, 851–874.
4. YY Lee-Hilz, M. Stolaki, W.J.H. van Berkel, J.M.M.J.G. Aarts, I.M.C.M. Rietjens, Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation, Food Chem Toxicol., 2008, **46**, 2128–2134.
5. H Xu, KH Kulkarni, R Singh, Z. Yang, S.W.J. Wang, V.H. Tam, M. Hu, Disposition of naringenin via glucuronidation pathway is affected by compensating efflux transporters of hydrophilic glucuronides, Mol Pharm., 2009, **6**, 1703–1715.
6. R Boonpawa, A Spenkeliink, I.M.CM. Rietjens, A Punt, A physiologically based kinetic (PBK) model describing plasma concentrations of quercetin and its metabolites in rats, Biochem Pharmacol., 2014, **89**, 287–299.
7. P. Ader, A Wessmann, S. Wolffram, Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig, Free Radic Biol Med., 2000, **28**, 1056-1067.
8. GL Amidon, H Lennernas, V.P. Shah, J.R Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability, Pharm Res., 1995, **12**, 413–420.
9. M. Ofer, S. Wolffram, A Koggel, H. Spahn-Langguth, P. Langguth, Modulation of drug transport by selected flavonoids: Involvement of P-gp and OCT?, Eur J Pharm Sci., 2005, **25**, 263–271.
10. A García-Arieta, Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence, Eur J Pharm Sci., 2014, **65**, 89–97.
11. K Lan, J.L He, Y. Tian, F. Tan, X. Jiang, L. Wang, L. Ye, Intra-herb pharmacokinetics interaction between quercetin and isorhamnetin, Acta Pharmacol Sin., 2008, **29**, 1376–1382.
12. T. Nishijima, Y. Takida, Y. Saito, T. Ikeda, K. Iwai, Simultaneous ingestion of high-methoxy pectin from apple can enhance absorption of quercetin in human subjects, Br J Nutr., 2015, **113**, 1531–1538.
13. N Orrego-Lagarón, M. Martínez-Huélamo, A Vallverdú-Queralt, R Lamuela-Raventos, E. Escribano-Ferrer, High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism, Br J Nutr., 2015, **114**, 169–180.

.. Resultados

14. M.N. Chabane, A. Al Ahmad, J. Peluso, C.D. Muller, G. Ubeaud, Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells, *J Pharm Pharmacol.*, 2009, **61**, 1473–1483.
15. X.J. Tian, X.W. Yang, X. Yang, K. Wang, Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model, *Int J Pharm.*, 2009, **367**, 58–64.
16. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03467> (accessed may 2015).
17. J. Rothwell, A.J. Day, M.R. Morgan, Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids, *J Agric Food Chem.*, 2005, **53**, 4355–4360.
18. W. Mullen, C.A. Edwards, A. Crozier, Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions, *Br J Nutr.*, 2006, **96**, 107–116.
19. K.A. O’Leary, A.J. Day, P.W. Needs, F.A. Mellon, N.M. O’Brien, G. Williamson, Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism, *Biochem Pharmacol.*, 2003, **65**, 479–491.
20. B.A. Graf, C. Ameho, G.G. Dolnikowski, P.E. Milbury, C. Chen, J.B. Blumberg, Rat Gastrointestinal Tissues Metabolize Quercetin, *J Nutr.*, 2006, **136**, 39–44.
21. R. Cermak, Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism, *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 2008, **4**, 17–35.
22. N. Petri, C. Tannergren, B. Holst, F.A. Mellon, Y. Bao, G.W. Plumb, J. Bacon, K.A. O’Leary, P.A. Kroon, L. Knutson, P. Forsell, T. Eriksson, H. Lennernas, G. Williamson, Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo, *Drug Metab Dispos.*, 2003, **31**, 805–813.
23. K.S. Krogholm, L. Bredsdorff, P. Knuthsen, J. Haraldsdóttir, S.E. Rasmussen, Relative bioavailability of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin given simultaneously through diet, *Eur J Clin Nutr.*, 2010, **64**, 432–435.
24. M. Silberberg, C. Morand, C. Manach, A. Sacalbert, C. Remesy, Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism, *Life Sci.*, 2005, **77**, 3156–3167.
25. K.C. Lund, T. Pantuso, Combination Effects of Quercetin, Resveratrol and Curcumin on In Vitro Intestinal Absorption, *J Restor Med.*, 2014, **3**, 112–120.
26. A. Galijatovic, U.K. Walle, T. Walle, (2000) Induction of UDP-glucuronosyl-transferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells, *Pharm Res.*, 2000, **17**, 21–26.

27. Y. Yang, Z. Zhang, S. Li, X. Ye, X. Li, K. He, Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis, *Fitoterapia.*, 2014, **92**, 133–147.
28. A. Dahan, B.T. West, G.L. Amidon, Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat, *Eur J Pharm Sci.*, 2009 **36**, 320–329.
29. E.R. Olson, T. Melton, Z. Dong, G.T. Bowden, Stabilization of Quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes, *Cancer Prev Res.*, 2008 **1**, 362–368.
31. S. Tulipani, M. Martinez Huelamo, M. Rotches Ribalta, R. Estruch, E. Escribano-Ferrer, C. Andres-Lacueva, M. Illan, R.M. Lamuela-Raventós, Oil matrix effects on plasma exposure and urinary excretion of phenolic compounds from tomato sauces: Evidence from a human pilot study, *Food Chem.*, 2012, **130**, 581–590.
32. M.V.S. Varma, R. Panchagnula, Prediction of *in vivo* intestinal absorption enhancement on P-glycoprotein inhibition, from rat *in situ* permeability, *J Pharm Sci.*, 2005, **94**, 1694–1704.
33. S.C. Sutton, M.T. Rinaldi, K.E. Vukovinsky, Comparison of the gravimetric, phenol red, and ¹⁴C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model, *AAPS PharmSci.*, 2001, **3**, E25.
34. P. Zakeri-Milani, H. Valizadeh, H. Tajerzadeh, Y. Azarmi, Z. Islambolchilar, S. Barzegar, M. Barzegar-Jalali, Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion to rat, *J Pharm Pharm Sci.*, 2007, **10**, 368–379.
35. T. Incecayir, Y Tsume, G.L. Amidon, Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification, *Mol Pharm.*, 2013, **10**, 958–966.
36. I. Komiya, J.Y. Park, A. Kamani, N.F.H. Ho., W.J. Higuchi, Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes, *Int J Pharm.*, 1980, **4**, 249–262.
37. R.A. Walgren, U.K. Walle, T. Walle, Transport of Quercetin and Its Glucosides across Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells, *Biochem Pharmacol.*, 1998, **55**, 1721–1727.
38. X. Chen, O.Q.P. Yin, Z. Zuo, M.S.S. Chow, Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites, *Pharm Res.*, 2005, **22**, 892–901.
39. W. Jiang, M. Hu, Mutual interactions between flavonoids and enzymatic and transporter elements responsible for flavonoid disposition via phase II metabolic pathways, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 7948–7963.
40. C.C. Weber, S. Kressmann, G. Fricker, W.E. Müller, Modulation of P-glycoprotein function by St John's Wort extract and its major constituents, *Pharmacopsychiatry*, 2004, **37**, 292–298.

.. Resultados.....

41. Y. Mitsunaga, H. Takanaga, H. Matsuo, M. Naito, T. Tsuruo, H. Ohtani, Y. Sawada, Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood–brain barrier, *Eur J Pharmacol.*, 2000, **395**, 193–201.
42. J.S. Choi, B.W. Jo, Y.C. Kim, Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of paclitaxel or prodrug to rats pretreated with quercetin, *Eur J Pharm Biopharm.*, 2004, *57*, 313–318.
43. D. Nikolic, R.B. Van Breemen, New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes, *Drug Metab Dispos.*, 2004, **32**, 387–397.
44. F. Marchetti, C. De Santi, M. Vietri, A. Pietrabissa, R. Spisni, F. Mosca, G.M. Pacifici, Differential inhibition of human liver and duodenum sulphotransferase activities by quercetin, a flavonoid present in vegetables, fruit and wine, *Xenobiotica*, 2001, **31**, 841–847.

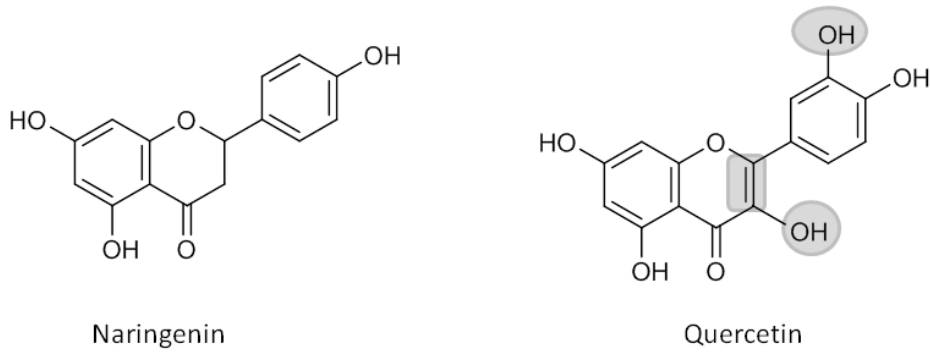


Fig.1. Naringenin and quercetin chemical structures.

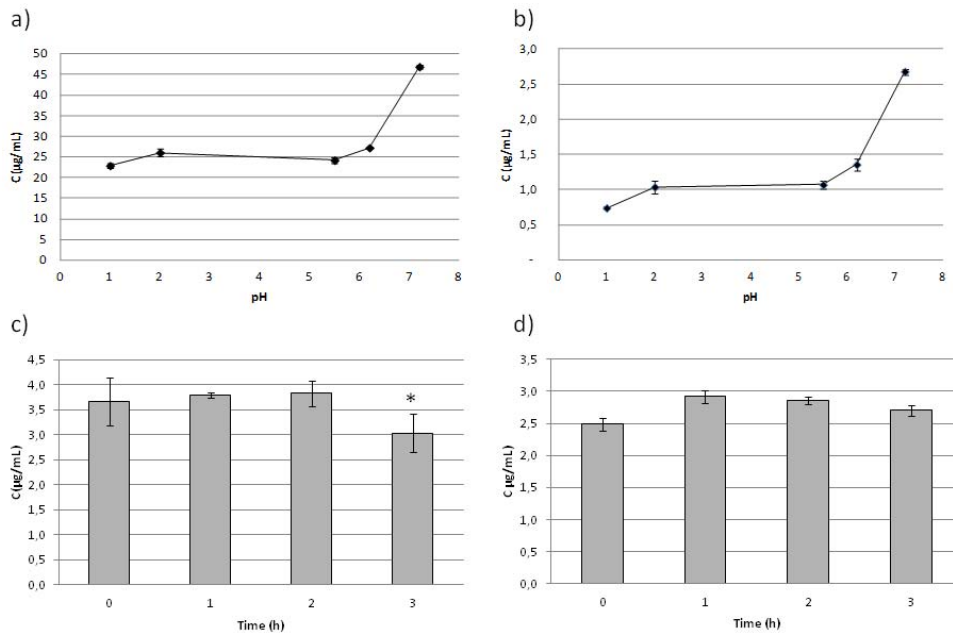


Fig.2. pH-solubility profile of naringenin (a) and quercetin (b) and concentrations of naringenin (c) and quercetin (d) in the perfusion buffer pH 6.2 vs. time in the stability study. Values are expressed as means and standard deviations (vertical bars). *Significantly different from time 0 ($P < 0.05$).

APPENDIX: TABLES

Table 1. Physicochemical properties of NAR and QUER.

Compound	MW (g/mol)	Log P	SpH 6.2 ($\mu\text{g/ml}$)d
NAR	272.25	2.52a 2.84b	27.2 \pm 0.18
QUER	302.24	1.48a 1.82c \pm 0.32	1.36 \pm 0.08

a [14], b [16]; c [17]; d experimental values

Table 2. Mechanisms involved in the crossing of the intestinal membrane for the aglycones NAR and QUER, according to Chabane et al. [14]

Compound	INPUT		OUTPUT		
	Passive diffusion	OATP-B (apical)	MRP1 (basolateral)	MRP2 (apical)	P-gp (apical)
NAR	+	-----	+	+	+
QUER	+	+	-----	+	-----

Table 3. UPLC-ESI-MS/MS settings for the phenolic compounds.

Compound	RT(min)	MS/MS	DP (V)	FP (V)	CE (V)	EP (V)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
NAR*	3.51	271→151	-50	-190	-30	-11	0.00255	0.008513
NAR-GLU*	2.55	447→271	-50	-190	-30	-11	0.000715	0.00238
NAR-SULF	4.80	351→271	-50	-190	-30	-11	—	—
NAR-O-SULF-O-GLU	2.61	527→447	-50	-190	-30	-11	—	—
QUER*	3.12	301→151	-60	-210	-30	-11	0.0438	0.0163
QUER-GLU*	2.26	477→301	-30	-200	-30	-11	0.00342	0.01142
QUER-SULF	5.39	381→301	-60	-210	-30	-11	—	—
QUER-diGLU	2.39	653→477	-30	-200	-30	-11	—	—
ISORH*	3.66	315→151	-60	-210	-30	-11	0.172	0.574
ISORH-GLU	2.58	491→315	-60	-210	-30	-11	—	—
ISORH-SULF	5.07	395→315	-60	-210	-30	-11	—	—

RT, retention time; DP, declustering potential; FP, focusing potential; CE, collision energy; EP, entrance potential; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; * Identified with standard.

... *Resultados*

Table 4. Permeability coefficient, percentage of absorption, percentage in plasma and percentage in the bile. Results are expressed as mean \pm standard deviation (n=4-5).

Assay	Pe _{eff} 104 (cm/s)	% absorption	% plasma	% bile
NAR (alone)	7.71 \pm 0.82*	94.82 \pm 3.15*	29.10 \pm 6.72	----
NAR (co-administered with quercetin)	4.09 \pm 0.89	74.04 \pm 6.57	35.89 \pm 7.56	28.77
QUER (alone)	7.30 \pm 1.95*	85.02 \pm 1.37*	24.86 \pm 1.96	----
QUER (co-administered with naringenin)	3.18 \pm 0.45	65.48 \pm 6.15	16.39 \pm 3.97	20.17

*differences alone vs. co-administered (P<0.05)

Table 5. AUC of the metabolites in the intestinal perfusion normalized by the inlet concentration of the aglycone. Results are expressed as mean \pm standard deviation.

Compound	Metabolite	Alone (min)	Co-administered (min)
NAR	GLU	4.07* \pm 2.95	27.46 \pm 9.85
	SULF	48.31* \pm 7.17	151.71 \pm 37.65
QUER	ISORH-GLU	3.59* \pm 0.26	33.76 \pm 0.90
	ISORH-SULF	3.52* \pm 0.21	10.27 \pm 6.99
	GLU	0.75* \pm 0.24	1.23 \pm 0.11
	diGLU	0.43 \pm 0.052	0.93 \pm 0.52
	SULF	11.62 \pm 1.19	110.59 \pm 18.80

*differences alone vs. co-administered (P<0.05)

Table 6. Percentage of phase II metabolites in plasma. Results are expressed as mean \pm standard deviation.

Compound	Metabolite	Alone (%)	Co-administered (%)
NAR	GLU	23.15* \pm 8.57	43.78 \pm 7.21
	SULF	-----	-----
QUER	ISORH	-----	89.38 \pm 45.17
	ISORH-GLU	-----	16.40 \pm 5.12
	ISORH-SULF	-----	20.82 \pm 7.16
	GLU	-----	26.77 \pm 8.02
	SULF	-----	-----

*differences alone vs. co-administered (P<0.05)

Table 7. Percentage of phase II metabolites in bile.

Compound	Metabolite	Alone (%)	Co-administered (%)
NAR	GLU	-----	67.52
	SULF	-----	34.22
	O-SULF-O-GLU*	-----	75.24
QUER	ISORH	-----	-----
	ISORH-GLU	-----	88.18
	ISORH-SULF	13.62	90.52
	GLU	-----	31.74
	SULF	17.47	205.2

* Only analysed in the co-administration assay.

Discusión general



IV. DISCUSIÓN GENERAL

4.1. Absorción *in situ* de la naringenina en estómago, intestino delgado y colon.

Los valores de los coeficientes de permeabilidad obtenidos en los tres tramos del tracto gastrointestinal pusieron de manifiesto una mayor absorción de la naringenina en intestino delgado respecto al estómago y el colon ($7.80 \pm 1.54 \cdot 10^{-4}$ cm/s, $3.04 \pm 0.89 \cdot 10^{-4}$ cm/s y $5.49 \pm 1.86 \cdot 10^{-4}$ cm/s, respectivamente), aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tramos del intestino. Por otro lado, también se estudió la permeabilidad en intestino delgado del naproxeno, como ejemplo representativo de un compuesto de elevada permeabilidad; el valor de su coeficiente de permeabilidad fue de $6.39 \pm 1.23 \cdot 10^{-4}$ cm/s, similar al de la naringenina, con lo que se puede concluir que la naringenina es también un compuesto altamente permeable, y que su elevada permeabilidad se mantiene en el colon. Ambos productos, naringenina y naproxeno poseen propiedades fisicoquímicas que favorecen la absorción intestinal, como son bajo peso molecular y elevada lipofilia expresada como $\log P$ (272.25 g/mol y $\log P = 2.52$ (Chabane *et al.* 2009) vs. 230.26 g/mol y $\log P = 2.84$ (Drug Bank) para la naringenina y naproxeno, respectivamente). Otros autores como Fagerholm *et al.* 1996 y Masaoka *et al.* 2006 obtuvieron resultados similares para el naproxeno en ratas: la diferencia en la permeabilidad entre las zonas proximal y distal del intestino fueron despreciables en el caso de éste y otros compuestos lipofílicos. De acuerdo con estos resultados y a pesar de que la naringenina está descrita como un sustrato de la P-gp y de los transportadores MRP1 y de MPR2, ambos ATP-dependientes (Chabane *et al.* 2009), el principal mecanismo de absorción de la naringenina es la difusión pasiva. Sin embargo, este hecho puede dar lugar a interacciones farmacocinéticas con otros fármacos/compuestos que sean sustrato de los mismos transportadores que la naringenina, tal como ha sido descrito por Takanaga *et al.* 1998, Bailey *et al.* 1998, y Le Goff *et al.* 2002, 2005. También la naringenina es inhibidora de la isoforma CYP3A4, que juega un papel relevante en el metabolismo de un número muy elevado de fármacos xpolifenoles (Hsiu *et al.* 2002), aumentando así la potencialidad en las interacciones.

Respecto a los valores del coeficiente de permeabilidad determinados en el estómago, debe considerarse, que el ensayo de perfusión gástrica se realizó a una velocidad de flujo inferior a la de los ensayos de intestino (0.16 vs. 0.20 mL/min), con lo que en principio, los valores obtenidos no son comparables: al disminuir el flujo de perfusión, se aumenta el tiempo de residencia de la molécula en el lugar de absorción, ofreciéndole mayores oportunidades para ser absorbida. En efecto, los valores del coeficiente de permeabilidad en el estómago fueron inferiores a los intestinales, probablemente debido no sólo la disminución en el flujo sino también al cambio anatómico. No obstante su valor fue de una magnitud significativa.

..Discusión general.....

Tal como se observa en la **tabla 4.1**, los porcentajes de absorción aumentaron en el mismo sentido que el coeficiente de permeabilidad, pero no cambiaron en la misma magnitud. Es decir, de acuerdo con el valor del coeficiente de permeabilidad de la naringenina obtenido en el colon, se esperaría un mayor valor del porcentaje de absorción. La causa de esta diferencia puede atribuirse a la diferente longitud de los segmentos intestinales utilizados en los experimentos (1.5–2 cm en colon, 10–15 cm en intestino delgado y 1.1–1.35 cm en el estómago (y en este caso asumiendo que éste tenga una forma cilíndrica). El parámetro L (**ecuaciones 18 y 20**) afecta más al porcentaje absorbido que al coeficiente de permeabilidad. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Komiya *et al.* 1980, que estudió en rata la fracción de dosis absorbida y el coeficiente de permeabilidad de siete esteroides utilizando diferentes longitudes de segmento intestinal.

Tabla 4.1. Valores promedio de los coeficientes de permeabilidad y porcentaje de absorción de la naringenina en cada segmento gastrointestinal.

	Peff (10 ⁻⁴ cm/s)		Absorción (%)		n
	media	SD	media	SD	
Estómago	3.04	0.89	23.69	5.54	4
Intestino delgado	7.80	1.54	76.28*	6.78	4
Colon	5.49	1.86	28.01	7.37	5

Peff, coeficiente de permeabilidad; Absorción (%) para 10 cm en intestino delgado y 2 cm en colon; SD, desviación estandar; n, número de replicados; P<0.05 respecto a colon (Student's t-test).

4.2. Absorción *in situ* de la quercetina en intestino delgado

El coeficiente de permeabilidad de la quercetina en intestino delgado resultó ser de $7.30 \pm 1.95 \cdot 10^{-4}$ cm/s y su porcentaje de absorción de 85.02 ± 1.37 %, valores inferiores a los de la naringenina ($7.71 \pm 0.82 \cdot 10^{-4}$ cm/s y 94.82 ± 3.15 %, respectivamente). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chabane *et al.* 2009, que obtuvo también mayor permeabilidad para la naringenina vs. la quercetina en un estudio con células Caco-2. Dado que el coeficiente de permeabilidad de la quercetina es menor que el de la naringenina y el propanolol (Walgren *et al.* 1998), se puede decir que es un compuesto de permeabilidad moderada.

De acuerdo con sus características físico-químicas un bajo peso molecular y una alta lipofilia (302.24 g/mol y $\log P = 1.48$ (Chabane *et al.* 2009)) este compuesto también ve favorecido su paso a través de las membranas por difusión pasiva (Chabane *et al.* 2009; Tian X-J *et al.* 2009; Walgren *et al.* 1998).

4.3. Diferencias regionales en el metabolismo de la naringenina.

Con el objetivo de estudiar el efecto de primer paso intestinal de la naringenina tras su administración oral, se obtuvieron muestras de lumen intestinal, bilis y sangre (60 min) y se analizaron para identificar y cuantificar metabolitos derivados de la naringenina. En las muestras de lumen intestinal se hallaron principalmente sulfato derivados (NAR-SULF) y en menor proporción, glucoconjugados (NAR-GLU) ($P < 0.05$).

De acuerdo con la **figura 4.1**, los mayores niveles de metabolitos de fase II se obtuvieron en el intestino delgado, seguido del colon y del estómago. Los valores del área bajo la curva (AUC, *area under the curve*) normalizados por la concentración de entrada respecto al tiempo de NAR-SULF fueron 48.31 ± 7.17 min, 2.62 ± 1.35 min y 0.001 ± 0.002 min, para el intestino delgado, colon y estómago, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Chen *et al.*, 2003 que estudiaron la distribución de las SULFs en tejido gastrointestinal humano, y pusieron de manifiesto que en el intestino delgado había mayor actividad de sulfatación que en el estómago y colon. Un resultado similar fue obtenido para las UGTs, cuya actividad fue también superior en el intestino delgado (AUC de NAR-GLU 4.07 ± 2.95 min vs. 0.079 ± 0.027 min y 0.014 ± 0.006 min, para el colon y estómago, respectivamente). Gregory *et al.* 2004 y Xu *et al.* 2009 obtuvieron resultados similares.

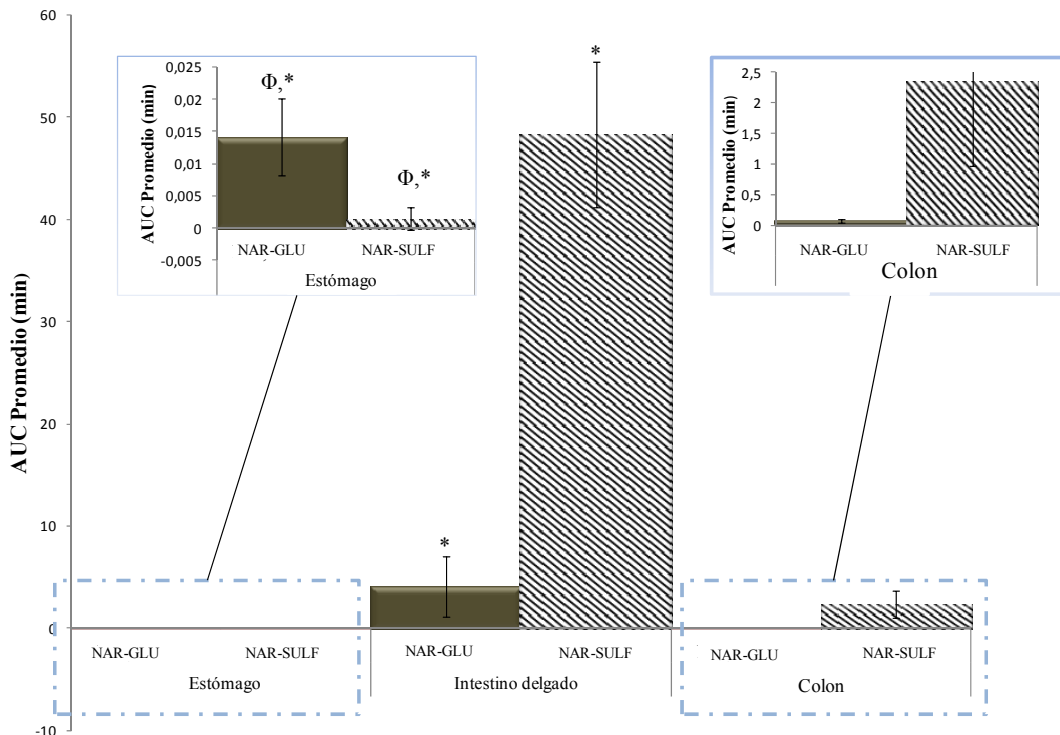


Figura 4.1. Valores promedio de área bajo la curva (AUC) de NAR-GLU y NAR-SULF en estómago, intestino delgado y colon (n 6, 4 y 6, respectivamente). Las desviaciones estándar están representadas como barras verticales. *, □ diferencias con el colon e intestino delgado ($P < 0.05$), respectivamente.

..Discusión general.....

En el lumen los principales metabolitos excretados fueron los sulfatos, de manera similar que en el hombre (Jeong *et al.* 2005). La sulfatación es una reacción metabólica de mayor afinidad pero de menor capacidad que la glucuronización (Chen *et al.* 2003), y dadas las bajas concentraciones ensayadas de naringenina, los mayores valores de sulfatos vs. glucurónidos son coherentes. Ambos metabolitos (sulfatos y glucurónidos) se hallaron en las muestras de perfusión a los 5 minutos iniciado el ensayo, pero en distinta proporción (**figura 4.2**).

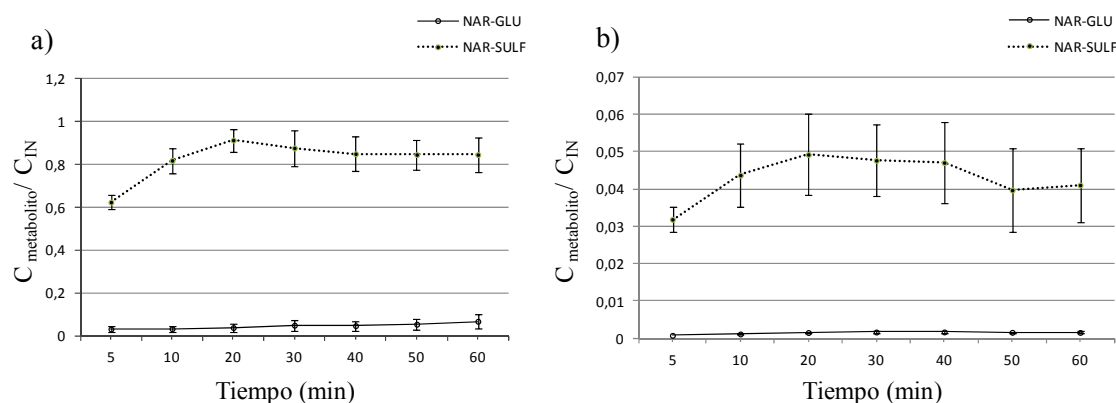


Figura 4.2. Valores promedio de concentración de metabolitos ($C_{\text{metabolito}}$) normalizada por la concentración de naringenina administrada (C_{IN}) respecto al tiempo en intestino delgado (a) y colon (b). Las barras representan la desviación estándar.

El porcentaje promedio de NAR-SULF a los 60 min fue de $84.00 \pm 12.14\%$ en el intestino delgado, mientras que para el glucurónido fue de un $8.40 \pm 5.67\%$ (**tabla 4.2**). Es decir, los niveles de NAR-SULF de los 10 min hasta 60 min (estado estacionario) resultaron del mismo orden de magnitud que el compuesto padre, mientras que para NAR-GLU fueron inferiores (con un perfil estacionario obtenido a los 30 min aproximadamente).

Tabla 4.2. Porcentaje de NAR-SULF y NAR-GLU en muestras de perfusion (60 min), bilis y plasma en los tres segmentos gastrointestinales

	NAR-SULF		NAR-GLU	
	promedio (%)	SD	promedio (%)	SD
Estómago				
Perfusión	0.007 ^{a,b}	0.004	0.03 ^{a,b}	0.006
Bilis	ND		ND	
Plasma	ND		9.260 ^{a,b}	2.200
Intestino delgado				
Perfusión	84.00 ^b	12.14	8.40 ^b	5.67
Bilis	ND		ND	
Plasma	ND		22.86 ^b	8.38
Colon				
Perfusión	3.66	1.75	0.16	0.03
Bilis	ND		ND	
Plasma	ND		2.990	1.610

SD, desviación estándar; ND, no detectado; a, b $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney test) respecto a intestino delgado y colon, respectivamente.

Sólo NAR-GLU (y no NAR-SULF) se halló en plasma, y el porcentaje mayor se obtuvo en los ensayos en intestino delgado ($22.86 \pm 8.38\%$). No se detectó NAR-GLU ni NAR-SULF en bilis. Respecto a estos resultados, diferentes autores publicaron datos contradictorios: por un lado, Fang *et al.* 2006 que estudiaron la biodisponibilidad de la naringenina y la naringin tras su administración oral en ratas, obtuvieron mayores niveles plasmáticos de NAR-SULF vs. NAR-GLU (5.4 veces mayores valores AUC), mientras que Xu *et al.* 2009 hallaron cantidades significativas de NAR-GLU en bilis de rata, más que el doble que en las muestras de lumen intestinal, y utilizando una técnica de perfusión similar a la utilizada en la presente tesis doctoral.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral y los elevados niveles de sulfatos hallados en el lumen intestinal respecto a los obtenidos en plasma y bilis, se sugiere que la sulfatación de la naringenina en ratón tiene lugar principalmente en el enterocito, más que en el hígado. Serían necesarias más investigaciones para estudiar con más profundidad las SULTs implicadas en el metabolismo intestinal de la naringenina. Respecto a la glucuronización, el proceso parece tener lugar tanto a nivel intestinal como hepático, y por tanto, la isoforma UGT1A (localizada en el retículo endoplasmático del enterocito) jugaría un papel importante en el metabolismo de primer paso de la naringenina y otros polifenoles (Manach *et al.* 2004).

Considerando los metabolitos de la microbiota, no se hallaron en lumen intestinal ácidos hidroxifenil propiónicos ni hidroxifenil acéticos tras su análisis por HPLC-MS-MS (**tabla 4.3**), En las muestras de lumen del colon se cuantificaron el ácido hipúrico y el ácido 4-hidroxihipurico que, de acuerdo con la **figura 4.3** provendrían de ácidos fenólicos formados en el lumen intestinal, y que tras su paso por el hígado sufrirían glicinación y β -oxidación (Serra *et al.* 2012; Aura, 2008; Gao *et al.* 2006; Rechner *et al.* 2004 ; Cong *et al.* 2001) y posteriormente con el tiempo se excretarían vía intestinal (y no biliar) dado que experimentos fueron realizados con el conducto biliar ligado. No obstante, esta ruta de eliminación también justifica la presencia de estos dos compuestos en plasma y bilis.

Por otro lado, aunque el ácido hipúrico podría proceder de otra fuente distinta de la del metabolismo de los polifenoles, como del metabolismo de los aminoácidos (Rechner *et al.* 2004), los elevados niveles obtenidos nos permite relacionarlo con la dosis de naringenina administrada. La ausencia en el lumen intestinal de los ácidos anteriormente mencionados, se justificaría por una rápida absorción intestinal de los mismos. En efecto, Konishi y Kobayashi (2004) publicaron la permeabilidad del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico mediante una ruta paracelular, y del ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico por transportadores monocarboxílicos.

..Discusión general.....

Tabla 4.3. Valores promedio del área bajo la curva, correspondientes a los metabolitos de la naringenina en el lumen colónico.

AUC (min)							
NAR-GLU		NAR-SULF		Ác 4-hidroxihipúrico		Ác hipúrico	
media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
0.079	0.027	2.616	1.347	0.219	0.072	0.168	0.012

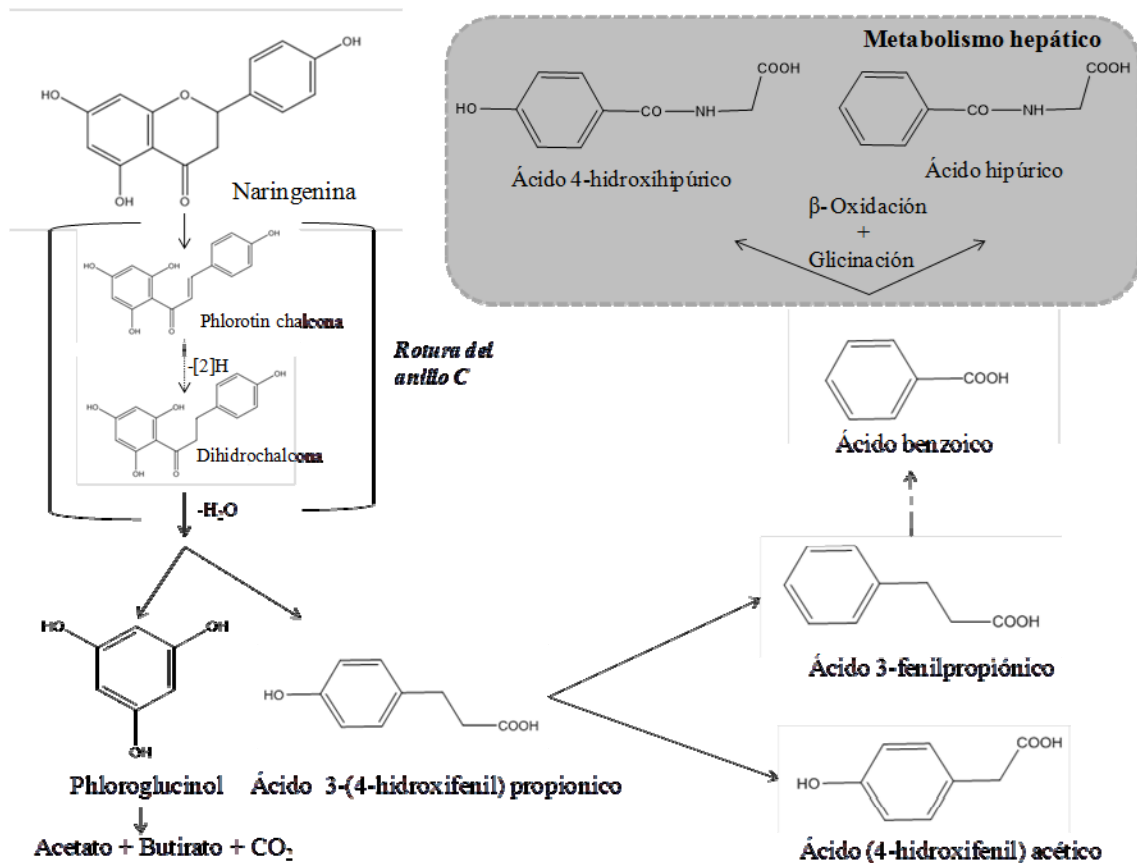


Figura 4.3. Ruta metabólica propuesta para el metabolismo de la naringenina en el colon (Boto-Ordoñez *et al.* 2014; Possimiers *et al.* 2011; Aura, 2008 y Rechner *et al.* 2004).

El floroglucinol no se encontró en las muestras de nuestro estudio, dado que es difícil hallarlo como metabolito final porque suele degradarse a acetato, butirato y CO₂ (Possimiers *et al.* 2011).

Es en las muestras de plasma y bilis de los ensayos de colon donde se caracterizaron un mayor número de metabolitos de naringenina, provenientes del metabolismo microbiano, debido al hecho de que el colon es la zona del tracto gastrointestinal más poblada de microorganismos (el colon humano contiene una concentración unos 10¹² microorganismos por gramo de contenido intestinal (Possimiers *et al.* 2011)). En las mismas muestras en los ensayos de estómago e

intestino delgado, no se detectan estos metabolitos, coincidiendo con una menor ocupación microbiana de estas zonas.

Por otro lado, y dado que los experimentos realizados en estómago y colon fueron los que dieron lugar a concentraciones más bajas de metabolitos, se planteó analizar estas muestras combinando la técnica del HPLC-ESI-MS/MS con otra más sensible, LC-ESI-LQT-Orbitrap-MS, con el objetivo de cuantificar e identificar los metabolitos. La combinación de ambas técnicas fue anteriormente utilizada por otros autores como Vallverdú-Queralt *et al.* 2012 ó Wu *et al.* 2013, permitiendo de esta manera conocer con mayor profundidad los perfiles fenólicos y metabólicos a partir de distintos productos naturales. La utilización combinada de las dos técnicas permitió identificar el doble de metabolitos (12 compuestos) en las muestras de perfusión respecto al uso aislado del HPLC-ESI-MS/MS, y en el caso del estómago permitió realizar el estudio más exhaustivo del metabolismo.

El uso de HPLC-ESI-MS/MS, no permitió la identificación de metabolitos de fase I procedentes de la actividad de los enzimas del CYP450; sin embargo, gracias a la gran sensibilidad del LC-ESI-LTQ-Orbitrap se identificaron dos compuestos de oxidación: apigenina (4',5,7-trihydroxiflavona) y un compuesto monooxidado identificado por "FTMS mode", probablemente un análogo 3' hidroxilado, eriodictiol, y/o un aromadendrin o una hidroxiquinona, de acuerdo con Nikolic y Breemen, 2004. Además, fue posible identificar un compuesto formado por la reducción del carbono C-4, propuesto como 4,5,7,4'-tetrahydroxiflavona. Los tres compuestos se encontraron en muestras de lumen del ensayo de colon mientras que la apigenina sólo en estómago, confirmando como en estos niveles del tracto gastrointestinal también se produce metabolismo en fase I, responsable también de la baja biodisponibilidad de la naringenina.

Respecto al metabolismo en fase II, los metabolitos formados debido a la acción de SULFs y UGTs e identificados y cuantificados por el HPLC-ESI-MS/MS fueron simplemente confirmados por el LTQ-Orbitrap. Además y como era de esperar por la ausencia de un grupo catecol en la estructura de la naringenina, la búsqueda de un posible compuesto metilado o conjugado con un grupo GSH fue negativa, reforzando los trabajos de Paulíková y Berczeliová, 2005 y Felgines *et al.* 2000.

Retomando el tema del metabolismo microbiano, el análisis de las muestras de perfusión por LTQ-Orbitrap puso de manifiesto la presencia de metabolitos microbianos, hecho que no había sido posible con la técnica HPLC-ESI-MS/MS. En las muestras de estómago se encontraron phloroglucinol y el ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, derivados de la escisión de la naringenina por el grupo carbonilo. Este hallazgo a su vez confirma la existencia de microorganismos en el estómago, como ya habían postulado con anterioridad Bik *et al.* 2006 y Wang y Yang , 2013

..Discusión general.....

que estudiaron la composición microbiana del estómago (población 10^3 veces menor que en colon). En las muestras de colon no solo se identificaron floroglucinol y ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, sino que también fueron detectados el ácido 3-fenilpropiónico y el ácido (4-hidroxifenil) acético producidos por la acción de la microbiota y el ácido 3-fenilpropiónico y ácido (4-hidroxifenil) acético por la acción de los enzimas hepáticos.

Resumiendo, gracias al uso del LTQ-Orbitrap en muestras de lumen de estómago se identificaron 3 metabolitos más que mediante el uso exclusivo del HPLC-ESI-MS/MS: apigenina, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico y floroglucinol. En colon se produce un incremento en el número de metabolitos de la naringenina identificándose; apigenina, el producto monooxidado y el reducido (metabolismo en fase I), ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, floroglucinol, ácido 3-fenilpropiónico y ácido (4-hidroxifenil) acético del metabolismo microbiano.

4.4. Influencia de la microbiota en la permeabilidad intestinal y en el metabolismo de la naringenina.

El objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar la influencia de la microbiota en la absorción y metabolismo de la naringenina. Para ello se administró Rifaximina (50 mg/kg, 5 d) por sonda gástrica. De acuerdo con los resultados de la **tabla 4.4**, y contrariamente a lo que cabría esperar, el pre-tratamiento con Rifaximina dio lugar a un descenso en la permeabilidad de la naringenina en el colon.

Tabla 4.4. Valores promedio de los coeficientes de permeabilidad y porcentaje de absorción de la naringenina en colon, sin y con tratamiento antibiótico.

	Peff (10^{-4} cm/s)		Absorción (%)		n
	media	SD	media	SD	
Colon	5.49*	1.86	28.01*	7.37	5
Colon (Rifaximina)	2.26	0.96	11.18	4.46	5

Peff, coeficiente de permeabilidad; Absorción (%) para 10 cm en intestino delgado y 2 cm en colon; SD, desviación estándar; n, número de replicados; * $P < 0.05$ (Student's t-test).

Esta disminución de la permeabilidad está de acuerdo con el menor porcentaje de naringenina y NAR-GLU observado en plasma en los animales tratados respecto al grupo control (**tabla 4.5**). Por el contrario, los niveles en plasma de NAR-SULF aumentaron ligeramente en los animales tratados con Rifaximina.

Los metabolitos de fase II en el lumen intestinal (NAR-GLU y NAR-SULF) no cambiaron significativamente tras el tratamiento con Rifaximina (**tabla 4.6**), hecho lógico ya que estos metabolitos proceden del metabolismo intestinal y hepático.

Tabla 4.5. Porcentaje de metabolitos de fase II y microbianos en bilis (pool) y plasma (valor promedio) en los experimentos de colon en el grupo control y en el grupo tratado con Rifaximina (n=5-6).

	BILIS		PLASMA			
	Control	Tratado	Control media	SD	Tratado media	SD
NAR-GLU	ND	ND	2.99 ^a	1.61	0.49	0.31
NAR-SULF	ND	ND	ND		0.70	0.20
Ác. 3-(4-hidroxifenil) propiónico	7.43	8.30	10.34	3.14	13.63	4.18
Ác. 4-hidroxihipúrico	41.97	20.01	1.12	0.76	1.49	0.70
Ác hipúrico	3.28	1.10	1.87	0.80	1.45	0.44
Ác. 3-fenilpropiónico	48.11	125.68	59.77	15.39	60.39	16.40
Ác. (4-hidroxifenil) acético	16.88	2.54	1.97 ^b	0.91	3.66	0.75

SD, desviación estándar; ND, no detectado; ^a P<0.05 (Mann-Whitney U-test); ^b P<0.05 (Student's t-test)

Tabla 4.6. Valores promedio del área bajo la curva (AUC) de los metabolitos en el lumen colónico en ratones control y en ratones tratados con Rifaximina.

	AUC (min)							
	NAR-GLU		NAR-SULF		Ác. 4-hidroxihipúrico		Ác hipúrico	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
Control	0.079 ^a	0.027	2.616	1.347	0.219 ^{a,b}	0.072	0.168 ^a	0.012
Tratado	0.042 ^a	0.044	4.207	2.326	0.072 ^{a,c}	0.036	0.062 ^a	0.001

SD, desviación estándar; a, b P< 0.05 respecto a NAR-SULF y NAR-GLU, respectivamente (Kruskal-Wallis Z-test); c, P<0.05 respecto al grupo control (Student's t-test).

Respecto a los metabolitos microbianos, aunque eran de esperar mayores niveles en el grupo control respecto al grupo tratado con antibiótico, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Ésto puede deberse a que el tratamiento antibiótico no eliminó completamente la microbiota intestinal, sino que pudo disminuir y/o alterar su composición. En este sentido, Gao *et al.* 2014 observaron en ratas cómo tras un tratamiento con Rifaximina, los niveles de *Lactobacillus* sp. aumentaban en el íleon. En el presente trabajo se observó un aumento del ácido 3-fenilpropiónico en la bilis, y del ácido (4-hidroxifenil) acético en plasma de los animales tratados (tabla 4.5).

Cabe destacar el elevado porcentaje del ácido 3-fenilpropiónico hallado en las muestras; su elevada presencia quedaría justificada no sólo por la acción metabólica de las bacterias sobre la naringenina, sino también por su actividad sobre por otros componentes de la dieta como los aminoácidos fenólicos fenilalanina y tirosina (Spoelstra SF 1978, Lord RS y Bradley JA 2008). Por otro lado, teniendo en cuenta el elevado porcentaje de los metabolitos microbianos presentes en las muestras biológicas, es interesante considerar su posible aportación a los efectos

..Discusión general.....

beneficiosos que se atribuyen a la naringenina. En este contexto, ácidos hidroxilados como el 3-fenilpropiónico y fenilacéticos mantienen propiedades antioxidantes, y otros como el ácido (4-hidroxifenil) acético está descrito como más efectivo que el compuesto padre (rutina y quercetina) en producir inhibición plaquetaria *in vitro* (Konishi y Kobayashi, 2004). También Miene *et al.* 2011 pusieron de manifiesto actividad antiinflamatoria de los ácidos (3,4-dihidroxifenil) acético y 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico en células colónicas humanas. De todo ello podría hipotetizarse que tras la ingesta de naringenina en la dieta, la matriz alimentaria podría favorecer la producción de metabolitos microbianos dado que los productos prebióticos y probióticos pueden estimular la fermentación intestinal y la actividad de la microbiota colónica (Manach *et al.* 2004). Además, la naringenina podría unirse a componentes de la matriz, hacer que permaneciera durante mayor tiempo en la luz intestinal y estar más disponible a la acción de la microbiota.

4.5. Metabolismo de la quercetina en los ensayos de absorción *in situ*.

Al igual que para la naringenina, en el caso de la quercetina, los metabolitos de fase II se encontraron en mayor concentración (AUC) en lumen intestinal respecto a plasma y bilis, siendo mayoritarios los sulfatos (11.62 ± 1.19 min para quercetin-sulfato (QUER-SULF) y 0.75 ± 0.24 min para quercetin-glucurónido (QUER-GLU)) (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Valores promedio (\pm DS) del área bajo la curva vs. tiempo (AUC) de los metabolitos en el lumen intestinal normalizados por la concentración de entrada de la aglicona.

Compuesto	Metabolito	AUC (min)
NAR	GLU	4.07 ± 2.95
	SULF	48.31 ± 7.17
QUER	ISORH-GLU	3.59 ± 0.26
	ISORH-SULF	3.52 ± 0.21
	GLU	0.75 ± 0.24
	diGLU	0.43 ± 0.052
	SULF	11.62 ± 1.19

En bilis (tabla 4.8), y contrariamente a los datos obtenidos para la naringenina, se observaron isorhamnetin-sulfato (ISORH-SULF: 13.62%) y QUER-SULF (17.47%). El bajo metabolismo hepático coincide con los resultados publicados por Chen *et al.* 2005, el cual tras la administración oral e intravenosa de quercetina en ratas observó un 3.1% de metabolismo

hepático y una recirculación enterohepática no significativa, a diferencia del 93.3% de metabolismo intestinal.

Tabla 4.8. Porcentaje de metabolitos de fase II en bilis.

Compuesto	Metabolito	Porcentaje (%)
QUER	ISORH	----
	ISORH-GLU	----
	ISORH-SULF	13.62
	GLU	-----
	SULF	17.47

4.6. Coadministración de naringenina y quercetina. Influencia en la absorción y en el metabolismo.

La administración conjunta de naringenina y quercetina provocó una disminución del 50% de la permeabilidad de ambas moléculas, de manera similar a la reducción en la absorción observada en ratas por Silberberg *et al.* (2005) al administrar quercetina y catequina simultáneamente. Dado que los mecanismos implicados en el transporte a través de membrana de la naringenina y quercetina incluyen, además de la difusión pasiva, su unión a transportadores de influjo y eflujo (tabla 4.9), este hecho puede deberse a una interacción con los mismos.

Tabla 4.9. Mecanismos implicados en el paso a través de membrana de la naringenina y quercetina (Chabane *et al.* 2009).

Compuesto	INPUT		OUTPUT		
	Difusión pasiva	OATP-B (apical)	MRP1 (basolateral)	MRP2 (apical)	P-gp (apical)
Naringenina	+	----	+	+	+
Quercetina	+	+	----	+	----

Los flavonoides además de ser sustratos de algunos transportadores están descritos como sus reguladores. A título de ejemplo, la quercetina en estudios *in vitro* ha demostrado tener un efecto bifásico sobre la P-gp en función de la concentración (Jiang y Hu, 2012; Weber *et al.* 2004): a bajas concentraciones (≈ 10 nM-100 nM) inducía la actividad de la P-gp mientras que a concentraciones mayores (≈ 1 μ M) la inhibía. De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, la quercetina a la concentración de 6.6 μ M en ratón parece inducir la

..*Discusión general*.....

actividad de la P-gp, produciendo así una disminución en la permeabilidad de la naringenina. Esta hipótesis está de acuerdo con otros autores (Mitsunaga *et al.* 2000) que observaron también una activación de la P-gp por parte de la quercetina a bajas concentraciones produciéndose mayor secreción intestinal de la naringenina. Además, la quercetina es capaz de inhibir entre un 22-37% la actividad del transportador MRP1 (Leslie *et al.* 2001), aspecto que también podría contribuir al descenso en la absorción de la naringenina.

Los niveles plasmáticos de la aglicona quercetina a los 60 min de iniciado el experimento de perfusión disminuyeron en la coadministración, de acuerdo con el descenso en la permeabilidad observado (**tabla 4.10**). Sin embargo, en el caso de la naringenina la concentración plasmática se mantuvo del mismo orden. Este hecho podría explicarse por un efecto inhibitorio de la quercetina sobre la isoforma CYP3A4 responsable del metabolismo de la naringenina a apigenina y/u otros compuestos monooxidados (Choi *et al.* 2004; Nikolic y Breemen 2004).

Tabla 4.10. Valores promedio (± DS) del coeficiente de permeabilidad, porcentaje de absorción y porcentaje en plasma y bilis (n=4-5).

Ensayo	$P_{eff} \cdot 10^4$ (cm/s)	% absorción	% plasma	% bilis
Naringenina (sola)	7.71 ± 0.82*	94.82 ± 3.15*	29.10 ± 6.72	----
Naringenina (coadministrada con quercetina)	4.09 ± 0.89	74.04 ± 6.57	35.89 ± 7.56	28.77
Quercetina (sola)	7.30 ± 1.95*	85.02 ± 1.37*	24.86 ± 1.96	----
Quercetina (coadministrada con naringenina)	3.18 ± 0.45	65.48 ± 6.15	16.39 ± 3.97	20.17

*diferencias sola vs. coadministrada (P < 0.05)

Respecto al metabolismo de fase II, se observó un aumento en estos metabolitos en las muestras de lumen intestinal, plasma y bilis cuando los dos aglicones fueron administrados conjuntamente (**tablas 4.11-4.13**)

Tabla 4.11. Valores promedio (\pm DS) de los metabolitos en el lumen intestinal normalizados por la concentración de entrada del aglicón.

Compuesto	Metabolito	Solo (min)	Coadministrado (min)
NAR	GLU	4.07* \pm 2.95	27.46 \pm 9.85
	SULF	48.31* \pm 7.17	151.71 \pm 37.65
QUER	ISORH-GLU	3.59* \pm 0.26	33.76 \pm 0.90
	ISORH-SULF	3.52* \pm 0.21	10.27 \pm 6.99
	GLU	0.75* \pm 0.24	1.23 \pm 0.11
	diGLU	0.43 \pm 0.052	0.93 \pm 0.52
	SULF	11.62 \pm 1.19	110.59 \pm 18.80

*diferencias solo vs. coadministrado (P < 0.05)

Tabla 4.12. Porcentajes promedio (\pm DS) de los metabolitos de fase II en plasma.

Compuesto	Metabolito	Solo (%)	Coadministrado (%)
NAR	GLU	23.15* \pm 8.57	43.78 \pm 7.21
	SULF	----	----
QUER	ISORH	----	89.38 \pm 45.17
	ISORH-GLU	----	16.40 \pm 5.12
	ISORH-SULF	----	20.82 \pm 7.16
	GLU	----	26.77 \pm 8.02
	SULF	----	----

*diferencias solo vs. coadministrado (P < 0.05)

Tabla 4.13. Porcentajes de los metabolitos de fase II en bilis.

Compuesto	Metabolito	Solo (%)	Coadministrado (%)
NAR	GLU	----	67.52
	SULF	----	34.22
QUER	O-SULF-O-GLU*	----	75.24
	ISORH	----	----
	ISORH-GLU	----	88.18
	ISORH-SULF	13.62	90.52
	GLU	-----	31.74
	SULF	17.47	205.2

*diferencias solo vs. coadministrado (P < 0.05)

..Discusión general.....

Considerando los glucoconjugados, su aumento puede ser explicado por un efecto inductor de la quercetina sobre los enzimas UGTs. Este hecho fue observado por Petri *et al.* 2003, que pusieron de manifiesto una inducción del enzima UGT1A1 de hasta 2.6 veces en el yeyuno en un ensayo *in vivo* (Loc-I-Gut) en el que se había administrado un extracto de cebolla y brócoli conteniendo 60 μM de quercetina. También Galijatovic *et al.* 2000 en un estudio *in vitro* en células Caco-2 observaron un aumento de hasta dos veces de la ruta de glucuronización después de un pretratamiento con quercetina. En el caso de los sulfatos, éstos también aumentaron en la coadministración, y no se puso de manifiesto el efecto inhibitor de la quercetina sobre las SULFs descrito previamente por otros autores (Cermak 2008; Marchetti *et al.* 2001).

Los metabolitos de fase II pueden ser excretados en el lumen intestinal y en la bilis con la intervención de los transportadores P-gp, MRP2 y BCRP (Xu *et al.* 2009). De esta manera la inducción de la P-gp por parte de la quercetina a bajas concentraciones podría explicar la elevada presencia de gluco y sulfato conjugados en estas muestras.

Conclusiones



V. CONCLUSIONES

De los diferentes trabajos que constituyen esta tesis doctoral se derivan las siguientes conclusiones:

1. De acuerdo con los valores de solubilidad hallados para naringenina, ésta es más soluble a medida que aumenta el pH, resultando la máxima solubilidad a pH 7.2 (46.87 ± 0.83 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C. De acuerdo con el valor máximo de solubilidad ($< 0.0047\%$) la naringenina puede considerarse como un compuesto poco soluble en agua.
2. La naringenina aumenta su estabilidad a pH ácido. A pH 2 ha resultado ser estable durante 3 h, mientras que a pH 6.2 y 7.2 durante 2 h, tiempo suficiente para la realización de los estudios de absorción.
3. Los valores de coeficiente de permeabilidad de la naringenina en el tracto gastrointestinal del ratón han oscilado entre $7.80 \pm 1.54 \cdot 10^{-4}$ cm/s en el intestino delgado y $3.04 \pm 0.89 \cdot 10^{-4}$ cm/s en el estómago. Dado que el valor en el intestino delgado es similar al obtenido para el naproxeno en el mismo tipo de ensayo y especie animal, y dado que este fármaco es considerado producto de referencia de alta permeabilidad según la BCS, puede concluirse que la naringenina es un compuesto de alta permeabilidad intestinal, y que por tanto no cabe esperar problemas en la biodisponibilidad debido a la absorción. Asimismo, los mayores porcentajes de absorción de la naringenina se han hallado en el intestino delgado ($76.28 \pm 7.37\%$), seguido del colon ($28.01 \pm 7.37\%$) y estómago ($23.69 \pm 5.54\%$).
4. El mecanismo principal de la absorción de la naringenina es la difusión pasiva, de acuerdo con el elevado valor del coeficiente de permeabilidad intestinal obtenido, y con sus características físico-químicas de peso molecular, $\log P$ y con el número de grupos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno.
5. Los elevados niveles de metabolitos hallados en las muestras biológicas indican que el elevado efecto de primer paso que sufre la naringenina tras su ingesta es la causa de su baja biodisponibilidad oral. Los principales metabolitos hallados en el lumen intestinal han sido los de fase II, y principalmente los sulfo-conjugados. Por el contrario, en plasma fueron superiores los niveles de los glucoconjugados y siempre inferiores a los niveles intestinales. Ello justifica un mayor metabolismo intestinal respecto al hepático.
6. El tratamiento antibiótico con Rifaximina (50 mg/kg durante 5 días) provocó cambios en la composición de la microbiota colónica que afectó negativamente a la permeabilidad de la naringenina y que redujo de forma significativa el número y la concentración de los metabolitos microbianos.
7. La combinación de dos técnicas cromatográficas (HPLC-ESI-MS/MS y LC-ESI-LTQ-Orbitrap) en el análisis de las muestras del lumen intestinal permite conocer mejor el

.. Conclusiones

perfil metabólico de la naringenina, debido a la mayor sensibilidad del LTQ-Orbitrap. Concretamente se identificaron 3 metabolitos adicionales: apigenina (metabolito de fase I), ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico y floroglucinol (ambos metabolitos microbianos) en estómago y a nivel de colon se identificaron el doble de metabolitos. La ampliación del perfil metabólico de la naringenina genera nuevos datos sobre los que poder estudiar el posible efecto beneficioso que puedan ejercer dichos metabolitos sobre la salud.

8. La quercetina ha presentado un perfil de solubilidad en función del pH similar al de la naringenina, pero con menor solubilidad ($2.67 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$). Ha resultado ser estable a pH 6.2 a 37 °C durante 3 h.
9. La permeabilidad de la quercetina y su porcentaje de absorción ($7.30 \pm 1.95 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s}$ y $85.02 \pm 1.37 \%$) han resultado ser algo inferiores a los de la naringenina e inferiores al propranolol. Por tanto, puede considerarse un compuesto de moderada permeabilidad.
10. Como en el caso de la naringenina, los niveles de metabolitos de fase II de la quercetina fueron superiores en el lumen intestinal respecto al plasma. El número de metabolitos detectados fue superior para la quercetina (isorhamnetin, isorhamnetin-glucurónido, isorhamnetin-sulfato, quecetín-glucurónido y quercetin-sulfato).
11. La co-administración de quercetina ($2.36 \mu\text{g/mL}$) con naringenina ($3.5 \mu\text{g/mL}$) ha provocado una disminución en la permeabilidad de ambos compuestos y un aumento del metabolismo intestinal y hepático, a juzgar por los mayores niveles de metabolitos hallados en lumen intestinal y bilis. A su vez, la co-administración de quercetina con naringenina ha incrementado la excreción biliar de las agliconas.
12. La mayor concentración de metabolitos de fase II hallada en bilis cuando se co-administran los compuestos respecto a la administración separada de las agliconas podrían favorecer la recirculación entero-hepática de los mismos, aumentando así su tiempo medio de residencia en el organismo.
13. La interacción observada a nivel de los procesos de absorción y metabolismo entre naringenina y quercetina aporta una información útil desde dos puntos de vista: por un lado se requieren más estudios a fin de conocer la actividad de los metabolitos y poder evaluar el efecto saludable de la interacción, y por otro, y considerando la elevada semivida de eliminación de la quercetina (unas el estudio puede ayudar a prevenir posibles interacciones entre determinados componentes de la dieta y algunos fármacos que utilicen mecanismos de absorción y eliminación similares.

Bibliografia



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-García B, Berrueta LA, Garmón-Lobato S, *et al.* (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, **1216**, 5398–5415.
- Adam A, Crespy V, Levrat-Verny M-A, *et al.* (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *The Journal of Nutrition*, **132**, 1962–1968.
- Ader P, Wessmann A, Wolfram S (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**, 1056-1067.
- Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, **12**, 413–420.
- Annadurai T, Muralidharan AR, Joseph T, *et al.* (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of Physiology Biochemistry*, **68**, 307–318.
- Anton SD, Embry C, Marsiske M, *et al.* (2014). Safety and metabolic outcomes of resveratrol supplementation in older adults: results of a twelve-week, placebo-controlled pilot study. *Experimental Gerontology*, **57**, 181–187.
- Arranz S, Martínez-Huélamo M, Vallverdu-Queralt A, *et al.* (2015). Influence of olive oil on carotenoid absorption from tomato juice and effects on postprandial lipemia. *Food Chemistry*, **168**, 203–210.
- Assini JM, Mulvihill EE, Sutherland BG, *et al.* (2013). Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice. *Journal of Lipid Research*, **54**, 711–724.
- Aura AM (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 407–429.
- Azuma K, Ippoushi K, Ito H, *et al.* (2002). Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**, 1706–1712.
- Bagheri SS, Shrivastava N, Baghel RS, *et al.* (2012). A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmaceutical Science*, **1**, 146-160.

..*Bibliografía*.....

- Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, *et al.* (1998). Grapefruit juice-drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **46** (2), 101-110.
- Baranska M, Schütze W, Schulz H (2006). Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, **78**, 8456–8461.
- Barnes S, Prasain J, D'Alessandro T, *et al.* (2011). The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food and Function*, **2**, 235–244.
- Belanger JMR, Paré JRJ, Sigouin M (1997). High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications. In: Instrumental methods in food analysis. Paré JRJ, Belanger JMR, Canada, Ed. Elsevier Science.
- Bieger J, Cermak R, Blank R, *et al.* (2008). Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *The Journal of Nutrition*, **138**, 1417–1420.
- Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, *et al.* (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 732–737.
- Bock KW, Eckle T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S (2000). Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, **59**, 467–470.
- Boocock DJ, Faust GES, Patel KR, *et al.* (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **16**, 1246–1252.
- Boonpawa R, Spenklink A, Rietjens IMCM, Punt A (2014). A physiologically based kinetic (PBK) model describing plasma concentrations of quercetin and its metabolites in rats. *Biochemical Pharmacology*, **89**, 287–299.
- Booth AN, Murray CW, Jones TJ, DeEDs F (1956). The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 251–257.
- Boots AW, Haenen GRMM, Bast A (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, **585**, 325–337.

..... Bibliografía..

- Boto-Ordóñez M, Rothwell JA, Andres-Lacueva C, *et al.* (2014). Prediction of the wine polyphenol metabolic space: an application of the Phenol-Explorer database. *Molecular Nutrition and Food Research*, **58** (3), 466-477.
- Bourne LC, Rice-Evans C (1998). Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **253**, 222–227.
- Breinholt VM, Svendsen GW, Dragsted LO, Hossaini A (2004). The citrus-derived flavonoid naringenin exerts uterotrophic effects in female mice at human relevant doses. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, **94**, 30-36.
- Bugianesi R, Catasta G, Spigno P, *et al.* (2002). Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *The Journal of Nutrition*, **132**, 3349–3352.
- Bugianesi R, Salucci M, Leonardi C, *et al.* (2004). Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and β -carotene in cherry tomatoes. *European Journal of Nutrition*, **43**, 360-366.
- Canaparo R, Finnström N, Serpe L, *et al.* (2007). Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clinical and Experimental Pharmacology*, **34**, 1138-1144.
- Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, *et al.* (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1238–1244.
- Cermak R (2008). Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, **4**, 17–35.
- Chabane M, Al Ahmad A, Peluso J, *et al.* (2009). Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**, 1473–1483.
- Chen G, Zhang D, Jing N, *et al.* (2003) Human gastrointestinal sulfotransferases: identification and distribution. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **187**, 186–197.
- Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS (1997). Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, **25**, 1045–1050.
- Chen S, Ding Y, Tao W, *et al.* (2012). Naringenin inhibits TNF- α induced VSMC proliferation and migration via induction of HO-1. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 3025–3031.

..*Bibliografía*.....

- Chen X, Yin OQP, Zuo Z, Chow MSS (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical Research*, **22**, 892–901.
- Chen Y, Huang C, Zhou T, *et al.* (2005). Biochanin A induction of sulfotransferases in rats. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, **24**, 102–114.
- Choi JS, Choi HK, Shin SC (2004). Enhanced bioavailability of paclitaxel after oral coadministration with flavone in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, **275**, 165–170.
- Choi JS, Jo BW, Kim YC (2004)a. Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of paclitaxel or prodrug to rats pretreated with quercetin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 313–318.
- Choudhury R, Chowrimootoo G, Srari K, *et al.* (1999). Interactions of the flavonoid naringenin in the gastrointestinal tract and the influence of glycosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **265**, 410–415.
- Cong D, Fong AK, Lee R, *et al.* (2001). Absorption of benzoic acid in segmental regions of the vascularly perfused rat small intestine preparation. *Drug Metabolism Disposition*, **29**, 1539-1547.
- Constantino L, Rastelli G, Gamberini MC, *et al.* (1999). 1-Benzopyran-4-one antioxidant as aldose reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **42**, 1881-1893.
- Crespy V, Morand C, Besson C, *et al.* (2002). Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 618–621.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, **26**, 1001–1043.
- Dahan A, West BT, Amidon GL (2009). Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **36**, 320–329.
- Davies JN, Hobson GE (1981). The constituents of tomato fruit: the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, **15**, 205–280.
- De Paepe D, Servaes K, Noten B, *et al.* (2013). An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. *Food Chemistry*, **136**, 368–375.

- Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, *et al.* (1969). Drug absorption I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal Pharmaceutical Science*, **58**, 1196-1200.
- Domenech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guihart C (2013). Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I. LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia. España. Ed. Síntesis, S.A.
- Drug Bank. <http://www.drugbank.ca>. Consultado en septiembre del 2015.
- Du G, Lin H, Yang S, *et al.* (2010). Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *International Immunopharmacology*, **10**, 819-826.
- Dumas Y, Dadomo M, Di Lucca G, Grolier P (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 369-382.
- Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, *et al.* (2007). Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *The Journal of Nutrition*, **137**, 2405-2411.
- Egert S, Rimbach G (2011). Which Sources of Flavonoids: Complex Diets or Dietary Supplements? *Advances in Nutrition*, **2**, 8-14.
- Eisen EJ (1976). Results of Growth Curve Analyses in Mice and Rats. *Journal of Animal Science*, **42**, 1008-1023.
- El-Aneed A, Cohen A, Banoub J (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, **44**, 210-230.
- EMA (2010). European Medicines Agency. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. London. <http://www.ema.europa.eu/>. Consultado agosto 2015.
- Erlund I (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, **24**, 851-874.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, *et al.* (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **56**, 545-553.

..Bibliografía.....

- Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*, **131**, 235–241.
- Escribano E, García Sala X, Salamanca J, et al. (2012). Single-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse. *International Journal of Pharmaceutics*, **436**, 472–477.
- Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H (1996). Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research*, **13**, 1336–1342.
- Fagerholm U, Lindahl A, Lennernäs H (1997). Regional Intestinal Permeability in Rats of Compounds with Different Physicochemical Properties and Transport Mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **49**, 687–690.
- Fallahi F, Roghani M, Moghadami S (2012). Citrus flavonoid naringenin improves aortic reactivity in streptozotocin-diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology*, **44**, 382–386.
- Fang T, Wang Y, Ma Y, et al. (2006). A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **40**, 454–459.
- FAOSTAT (2012). <http://faostat.fao.org/site/567>. Consultado agosto del 2015.
- FDA (2000). US Food and Drug Administration. Guidances for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System.
- FDA (2015). US Food and Drug Administration. <http://www.accessdata.fda.gov>. Consultado en diciembre del 2015.
- FDA (May 2015). US Food and Drug Administration Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. Draft Guidance.
- Felgines C, Texier O, Morand C, et al. (2000). Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, **279**, G1148–G1154.
- Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, et al. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, **130**, 797–813.

..... Bibliografía..

- Friedman M (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography, A*, **1054**, 143–155.
- Galijatovic A, Walle UK, Walle T (2000). Induction of UDP-glucuronosyl-transferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research*, **17**, 21–26.
- Gao J, Gilliland MG, Owyang C (2014). Rifaximin, gut microbes and mucosal inflammation: unraveling a complex relationship. *Gut Microbes*, **5**, 571–575.
- Gao K, Xu A, Krul C, *et al.* (2006). Of the Major Phenolic Acids Formed during Human Microbial Fermentation of Tea, Citrus, and Soy Flavonoid Supplements, Only 3, 4-Dihydroxyphenylacetic Acid has Antiproliferative Activity. *The Journal of Nutrition*, **136**, 52–57.
- García-Arieta A (2014). Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **65**, 89–97.
- Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **53**, 326S–334S.
- Giovannucci E (2005). Tomato products, lycopene, and prostate cancer: A review of the epidemiological literature, *The Journal of Nutrition*, **135**, 2030S–2031S.
- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*, **36**, 79–87.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, *et al.* (2001). Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, **41**, 492–499.
- Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, *et al.* (2006). Rat Gastrointestinal Tissues Metabolize Quercetin. *The Journal of Nutrition*, **136**, 39–44.
- Gregory P, Lewinsky RH, Gardner-Stephen D, Mackenzie PI (2004). Regulation of UDP glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **199**, 354–363.
- Griffin B, O’Driscoll C (2008). Models of the small intestine. In: Drug Absorption Studies. *In situ, in vitro* and *in silico* models. Ehrhardt C, Kim KJ, Nueva York, ed. Springer.

..Bibliografía.....

- Guarner F, Malagelada J-R (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, **361**, 512–519.
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **9**, 229-234.
- Guo X, Tresserra-Rimbau A, Estruch R, *et al.* (2016). Effects of Polyphenol, Measured by a Biomarker of Total Polyphenols in Urine, on Cardiovascular Risk Factors After a Long-Term Follow-Up in the PREDIMED Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, 1-11.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**, 125–126.
- Helmja K, Vaher M, Püssa T, *et al.* (2008). Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanum lycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, **29**, 3980-3988.
- Herrero-Martínez JM, Sanmartin M, Rosés M, *et al.* (2005). Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **26**, 1886–1895.
- Hogben CA, Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB (1957). Absorption of drugs from the stomach. II. The human. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **120**, 540–545.
- Hsiu SL, Huang TY, Hou YC, *et al.* (2002). Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life Science*, **70**, 1481-1489.
- Incecayir T, Tsume Y, Amidon GL. (2013). Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Molecular Pharmaceutics*, **10**, 958-966.
- Islam MA, Schmidt RW, Gunaseelan S, Sanchez A (2014). An update on the cardiovascular effects of quercetin, a plant flavonoid. *Current Nutrition*, **10**, 36-48.
- Japar D, Wu SP, Hu Y, *et al.* (2010). Significance and regional dependency of peptide transporter (PEPT1) in the intestinal permeability of glycylsarcosine: in situ single-pass perfusion studies in wild-type and Pept1 Knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition*, **38**, 1740-1746.
- Jeon SM, Kim HK, Kim HJ, *et al.* (2007). Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Translational Research*, **149**,15–21.

- Jeong EJ, Jia X, Hu M (2005). Disposition of formononetin via enteric recycling: metabolism and excretion in mouse intestinal perfusion and Caco-2 cell models. *Molecular Pharmaceutics*, **2**, 319–328.
- Jhonson LL, Barret KE, Gishan FK, Merchant JL, Said HM, Wood JD (2006). Physiology of the Gastrointestinal Tract. Fourth Edition. California, Ed. Elsevier Inc.
- Jiang W, Hu M (2012). Mutual interactions between flavonoids and enzymatic and transporter elements responsible for flavonoid disposition via phase II metabolic pathways. *RSC Advances*, **2**, 7948–7963.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, *et al.* (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3954–3962.
- Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, **61**, 472–477.
- Kang MJ, Kim HG, Kim JS, *et al.* (2013). The effect of gut microbiota on drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, **9**, 1295-1308.
- Kapoor R, Kakkar P (2014). Naringenin accords hepatoprotection from streptozotocin induced diabetes in vivo by modulating mitochondrial dysfunction and apoptotic signaling cascade. *Toxicology Reports*, **1**, 569-581.
- Kim CI, Leo MA, Lowe N, Lieber CS (1988). Differential effects of retinoids and chronic ethanol consumption on membranes in rats. *The Journal of Nutrition*, **118**, 1097–1103.
- Komiya I, Park JY, Kamani A, *et al.* (1980). Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. *International Journal of Pharmaceutics*, **4**, 249–262.
- Konishi, Y, Kobayashi, S (2004). Microbial Metabolites of Ingested Caffeic Acid Are Absorbed by the Monocarboxylic Acid Transporter (MCT) in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6418–6424.
- Krogholm KS, Bredsdorff L, Knuthsen P, *et al.* (2010). Relative bioavailability of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin given simultaneously through diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, **64**, 432–435.
- Lakhanpal P, Rai DK (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical*

..Bibliografía.....

Update, **2**, 22-37.

Lambert J (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research*, **523-524**, 201–208.

Lamuela-Raventós R, Vallverdú-Queralt A, Jauregui O, Martínez-Huelamo M, Quifer-Radá P (2014). Improved Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography. In Polyphenols in Plants; Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR. Arizona, EEUU. Ed. Elsevier Inc.

Lan K, He JL, Tian Y, *et al.* (2008). Intra-herb pharmacokinetics interaction between quercetin and isorhamnetin. *Acta Pharmacologica Sinica*, **29**, 1376–1382.

Larrosa M, Luceri C, Vivoli E, *et al.* (2009). Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition and Food Research*, **53**, 1044-1054.

Larson AJ, Symons JD, Jalili T (2012). Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: a review of efficacy and mechanisms. *Advances in Nutrition*, **3**, 36-46.

Le Goff N, Koffel JC, Vandenschrieck S, *et al.* (2002). Comparison of in vitro hepatic models for the prediction of metabolic interaction between simvastatin and naringenin. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **27**, 233-241.

Le Goff-Klein N, Koffel JC, Jung L, *et al.* (2005). In vitro inhibition of simvastatin metabolism, a HMG-CoA reductase inhibitor in human and rat liver by bergamottin, a component of grapefruit juice. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **18**, 31-35.

Lee KH, Park E, Lee HJ, *et al.* (2011). Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutrition Research and Practices*, **5**, 28-33.

Lee-Hilz YY, Stolaki M, van Berkel WJH, *et al.* (2008). Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2128–2134.

Lennernas H, Ahrenstedt Ö, Hällgren R, *et al.* (1992). Regional jejunal perfusion, a new approach to study oral drug absorption in man. *Pharmaceutical Research*, **9**, 1243-1251.

León Espinosa de los Monteros MT, Castillo Sánchez MD (2002). La dieta mediterránea está de moda. *Medicina General*, **49**, 902-908.

Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, *et al.* (2001). Modulation of multidrug resistance protein 1

(MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Molecular Pharmacology*, **59**, 1171–1180.

Lesser S, Cermak, R, Wolffram S (2000). Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *The Journal of Nutrition*, **134**, 1508-1511.

Liang L, Liu X, Wang Q, et al. (2013). Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of resveratrol and its prodrug 3,5,4'-tri-O-acetylresveratrol in rats. *Phytomedicine*, **20**, 558–563.

Lieber CS, DeCarli LM (1982). The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, **6**, 523–531.

Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 502–509.

Lin JH, Chiba M, Baillie T (1999). Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacological Reviews*, **51**, 135–158.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, 3–25.

Little JM, Williams L, Xu J, Radominiska-Pandya A (2002). Glucuronidation of the dietary fatty acids, phytanic acid and docosahexaenoic acid, by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition*, **30**, 531-533.

Lohr JW, Willsky GR, Acara M (1998). Renal drug metabolism. *Pharmacological Reviews*, **50**, 107–141.

Lord RS, Bradley JA (2008). Clinical applications of urinary organic acids. Part 2. Dysbiosis markers. *Alternative Medical Reviews*, **13**, 292-306.

Lugasi A, Bíró L, Hóvárie J, et al. (2003). Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population. *Nutrition Research*, **23**, 1035–1044.

Lund KC, Pantuso T (2014). Combination Effects of Quercetin, Resveratrol and Curcumin on *In Vitro* Intestinal Absorption. *Journal of Restorative Medicine*, **3**, 112–120.

..Bibliografía.....

- Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 771-777.
- Ma Y, Li P, Chen D, *et al.* (2006). LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma. *International Journal of Pharmaceutics*, **307**, 292-299.
- MAGRAMA (2013). Ministerio de agricultura, alimentación y medioambiente de España. <http://www.magrama.gob.es>. Consultado en agosto del 2015.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.
- Marchetti F, De Santi C, Vietri M, *et al.* (2001). Differential inhibition of human liver and duodenum sulphotransferase activities by quercetin, a flavonoid present in vegetables, fruit and wine. *Xenobiotica*, **31**, 841-847.
- Martínez-Huélamo M, Tulipani S, Estruch R, *et al.* (2015). The tomato sauce making process affects the bioaccessibility and bioavailability of tomato phenolics: a pharmacokinetic study. *Food Chemistry*, **173**, 864-872.
- Martínez-Huélamo M, Tulipani S, Torrado X, *et al.* (2012). Validation of a new LC-MS/MS method for the detection and quantification of phenolic metabolites from tomato sauce in biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 4542-4549.
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 323-330.
- Marvalín C, Azerad R (2011). Microbial glucuronidation of polyphenols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **73**, 43-52.
- Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoba M, *et al.* (2006). Site of absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **29**, 240-250.
- Mas-Serrano P, Granero L, Martín-Algarra R, *et al.* (2000). Kinetic study of acamprostate absorption in rat small intestine. *Alcohol and Alcoholism*, **35**, 324-330.

..... Bibliografía..

- Mata-Bilbao M de L, Andrés-Lacueva C, Roura E, *et al.* (2007). Absorption and pharmacokinetics of grapefruit flavanones in beagles. *The British Journal of Nutrition*, **98**, 86–92.
- McConnell EL, Basit AW, Murdan S (2008). Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in vivo experiments. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **60**, 63-70.
- McLuckey SA, Wells JM (2001). Mass analysis at the advent of the 21st century. *Chemical Reviews*, **101**, 571–606.
- Medina-Remón A, Tresserra-Rimbau A, Pons A, *et al.* (2015). Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, **25**, 60-67.
- Miene C, Weise A, Gleis M (2011). Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). *Nutritional Cancer*, **63**, 653-662.
- Miglioli PA, Allerberger F, Calabró GB, *et al.* (2001). Effects of daily oral administration of rifaximin and neomycin on faecal aerobic flora in rats. *Pharmacological Research*, **44**, 373-375.
- Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, *et al.* (2003). Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **47**, 64-69.
- Mitsunaga Y, Takanaga H, Matsuo H, *et al.* (2000). Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood–brain barrier. *European Journal of Pharmacology*, **395**, 193–201.
- Mohsen MA El, Marks J, Kuhnle G, *et al.* (2004). The differential tissue distribution of the citrus flavanone naringenin following gastric instillation. *Free Radical Research*, **38**, 1329–1340.
- Mols R, Brouwers J, Schinkel AH, *et al.* (2009). Intestinal perfusion with mesenteric blood sampling in wild-type and knockout mice: evaluation of a novel tool in biopharmaceutical drug profiling. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**, 1334–1337.
- Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, *et al.* (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, **1**, 233–253.

..*Bibliografía*.....

- Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME (2008). Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **29**, 205–217.
- Mudra DR, Borchardt RT (2010). Absorption barriers in the rat intestinal mucosa. 3: Effects of polyethoxylated solubilizing agents on drug permeation and metabolism. *Journal of Pharmaceutical Science*, **99**, 1016–1027.
- Mullen, W., Edwards, C. A., & Crozier A (2006). Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition*, **96**, 107–116.
- Mulvihill EE, Allister EM, Sutherland BG, et al. (2009). Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, **58**, 2198-2210.
- Mulvihill EE, Assini JM, Sutherland BG, et al. (2010). Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **30**, 742–748.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M (2013). Cardiovascular disease in Europe: Epidemiological update. *European Heart Journal*, **34**, 3028–3034.
- Nicoletti I, De Rossi A, Giovinazzo G, Corradini D (2007). Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 3304–3311.
- Nikolic D, Breemen RB Van (2004). New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, **32**, 387–397.
- Nishijima T, Takida Y, Saito Y, et al. (2015). Simultaneous ingestion of high-methoxy pectin from apple can enhance absorption of quercetin in human subjects. *British Journal of Nutrition*, **113**, 1531–1538.
- O’Leary KA, Day AJ, Needs PW, et al. (2003). Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-*O*-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*, **65**, 479–491.
- O’Neill ME, Carroll Y, Corridan B, et al. (2001). A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *The British Journal of*

Nutrition, **85**, 499–507.

Ofer M, Wolffram S, Koggel A, *et al.* (2005). Modulation of drug transport by selected flavonoids: Involvement of P-gp and OCT? *European Journal of Pharmaceutical Science*, **25**, 263–271.

Oh SJ, Kim O, Lee SJ, *et al.* (2010). Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 3227–3234.

Olson ER, Melton T, Dong Z, Bowden GT (2008). Stabilization of Quercetin paradoxically reduces its proapoptotic effect on UVB-irradiated human keratinocytes. *Cancer Prevention Research*, **1**, 362–368.

Orrego-Lagarón N, Martínez-Huélamo M, Vallverdú-Queralt A, *et al.* (2015). High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism. *British Journal of Nutrition*, **114**, 169–180.

Ortega N, Romero M-P, Macià A, *et al.* (2010). Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 298–305.

Otake Y, Nolan AL, Walle UK, Walle T (2000). Quercetin and resveratrol potently reduce estrogen sulfotransferase activity in normal human mammary epithelial cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **73**, 265–270.

Pandey KB, Rizvi SI (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2**, 270–278.

Paulíková H, Berczeliová E (2005). The effect of quercetin and galangin on glutathione reductase. *Biomedical Papers of the Faculty of Medicine of Universty Palacky*, **2**, 497–500.

Peters WHM, Jansen PLM (1988). Immunocharacterisation of UDP-glucuronyltransferase isoenzymes in human liver, intestine and kidney. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 564–567.

Petri N, Tannergren C, Holst B, *et al.* (2003). Absorption/metabolism of sulphoraphane and quercetin and regulation of Phase II enzymes in human jejunum in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, **31**, 805–813.

Petrovski G, Gurusamy N, Das DK (2011). Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1215**, 22–33.

..Bibliografía.....

- Pfeuffer M, Auinger A, Bley U, et al. (2011). Effect of quercetin on traits of the metabolic syndrome, endothelial function and inflammatory parameters in men with different APOE isoforms. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*, **23**, 403-409.
- Possemiers S, Bolca S, Verstraete W, Heyerick A (2011). The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, **82**, 53–66.
- Prabhakar PK, Kumar A, Doble M (2014). Combination therapy: a new strategy to manage diabetes and its complications. *Phytomedicine*, **21**,123–30.
- Quifer-Rada P, Vallverdú-Queralt A, Martínez-Huélamo M, et al. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, **169**, 336–343.
- Raffo A, Leonardi C, Fogliano V, et al. (2002). Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. *Naomi F1*) harvested at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6550–6556.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G (2012). Rang & Dale. *Farmacología*. Séptima Edición. España. Ed. Elsevier España.
- Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HMI (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **45**, 2821–2831.
- Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, et al. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical and Biological Medicine*, **36**, 212-225.
- Regueiro J, Sánchez-González C, Vallverdú-Queralt A, et al. (2014). Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, **152**, 340–348.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical and Biological Medicine*, **20**, 933–956.
- Rothwell JA, Day AJ, Morgan MRA (2005). Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4355–4360.

- Rowland M, Tozer TN (2011). *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Concepts and Applications*. Cuarta edición. Filadelfia. Ed. Williams & Wilkins.
- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, et al. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*, **83**, 6-15.
- Sahlin E, Savage GP, Lister CE (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 635-647.
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, et al. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 571-581.
- Salles, C (2003). Determination and gustatory properties of taste-active compounds in tomato juice. *Food Chemistry*, **81**, 395-402.
- Saponara S, Testai L, Iozzi D, et al. (2006). (+/-)-Naringenin as large conductance Ca(2+)-activated K+ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*, **149**, 1013-1021.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **56**, 276-282.
- Scarpignato C, Pelosini I (2005). Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. *Chemotherapy*, **51**, 36-66.
- Schurgers N, Bijdendijk J, Tukker JJ, Crommelin DJ (1986). Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anaesthetized rat in situ. *Journal of Pharmaceutical Science*, **75**, 117-119.
- Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán F (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6485-6501.
- Serra A, Macià A, Romero MP, et al. (2012). Metabolic pathway of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavonones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, **130**, 383-393.
- Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of Nutrition*, **127**, 1260-1268.

..*Bibliografía*.....

- Shi J, Cao H (2011). Molecular structure-affinity relationship of dietary flavonoids for bovine serum albumin. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **21**, 594–600.
- Shi Y, Williamson G (2015). Comparison of the urinary excretion of quercetin glycosides from red onion and aglycone from dietary supplements in healthy subjects: a randomized, single-blinded, cross-over study. *Food and Function*, **6**, 1443-1448.
- Shimoi K, Yoshizumi K, Kido T, et al. (2003). Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and alphaG-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2785–2789.
- Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, **215**, 213–219.
- Silberberg M, Morand C, Manach C, et al. (2005). Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sciences*, **77**:3156–3167.
- Skood DA, Holler FJ, Nieman TA (1992). Principios de análisis instrumental. Quinta edición. España. Ed. Interamericana de España S.A.U.
- Spoelstra SF (1978). Degradation of tyrosine in anaerobically stored piggery wastes and in pig feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**, 631-638.
- Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH (1999). UDPglucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*. **116**, 149-160.
- Sun X-Y, Plouzek CA, Henry JP, et al. (1998). Increased UDP-glucuronosyltransferase Activity and Decreased Prostate Specific Antigen Production by Biochanin A in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, **58**, 2379–2384.
- Sutton SC, Rinaldi MT, Vukovinsky KE (2001). Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. *AAPS PharmSci*, **3**, E25.
- Takamatsu N, Welage LS, Idkaidek NM, et al. (1997). Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PEG 400 determined by jejunal perfusion. *Pharmaceutical Research*, **14**, 1127-1132.
- Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, et al. (1998). Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in Caco-2 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **21**, 1062-1066.

..... Bibliografía..

- Tetens I, Turrini A, Tapanainen H, *et al.* (2013). Dietary intake and main sources of plant lignans in five European countries. *Food and Nutrition Research*, **57**, 1-10.
- Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F (1991). Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer*, **16**, 43–52.
- Thrön.M, Finnström N, Lundgren S, *et al.* (2005). Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **60**, 54-60.
- Tian X-J, Yang X-W, Yang X, Wang K (2009). Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics*, **367**, 58–64.
- Tortora GJ, Grabowski SR (2004). Principios de anatomía y fisiología. España. Ed. Reverté.
- Tresserra-Rimbau A, Rimm EB, Medina-Remón A, *et al.* (2014). Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, **24**, 639–647.
- Tulipani S, Martínez Huelamo M, Rotches Ribalta M, *et al.* (2012). Oil matrix effects on plasma exposure and urinary excretion of phenolic compounds from tomato sauces: Evidence from a human pilot study. *Food Chemistry*, **130**, 581–590.
- USDA (2015). National Nutrient Database for Standard Reference. Release 28.
<http://ndb.nal.usda>. Consultado en agosto del 2015.
- Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Medina-Remón A, *et al.* (2010). Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, **24**, 2986–2992.
- Vallverdú-Queralt A, Medina-Remón A, Martínez-Huélamo M, *et al.* (2011). Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 3994–4001.
- Vallverdú-Queralt A, Arranz S, Medina-Remón A, *et al.* (2011a). Changes in phenolic content of tomato products during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 9358–9365.

.. *Bibliografía*

- Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM (2012). Evaluation of a Method To Characterize the Phenolic Profile of Organic and Conventional Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 3373–3380. doi: 10.1021/jf204702f
- Vallverdú-Queralt A, De Alvarenga JF, Estruch R, et al. (2013). Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito. *Food Chemistry*, **41**, 3365–3372.
- Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huélamo M, et al. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, **154**, 299–307.
- Varma MVS, Panchagnula R (2005). Prediction of in vivo intestinal absorption enhancement on P-glycoprotein inhibition, from rat in situ permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **94**, 1694–1704.
- Vries JHM, Hollman PCH, Meyboom S, et al. (1998). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 60-65.
- Wahlang B, Pawar YB, Bansal AK (2011). Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **77**, 275–282.
- Walgren RA, Walle UK, Walle T (1998). Transport of Quercetin and Its Glucosides across Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *Biochemical Pharmacology*, **55**, 1721–1727.
- Walle T (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 829–837.
- Wang MJ, Chao PD, Hou YC, et al. (2006). Pharmacokinetics and conjugation metabolism of naringin and naringenin in rats after single dose and multiple dose administrations. *Journal of Food and Drug Analysis*, **14**, 247-253.
- Wang ZK, Yang YS (2013). Upper gastrointestinal microbiota and digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology*, **19**, 1541–1550.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. (1998). Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *The Journal of Nutrition*, **128**, 1710–1715.
- Weber CC, Kressmann S, Fricker G, Müller WE (2004). Modulation of P-glycoprotein function by St John's Wort extract and its major constituents. *Pharmacopsychiatry*, **37**, 292–298.

..... Bibliografía..

- Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL (2008). Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *The American Journal of Cardiology*, **101**, 75D–86D.
- Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43**, 1–18.
- Wolfender JL (2009). HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta Medica*, **75**, 719–734.
- Wood LG, Wark PAB, Garg ML (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Airway Disease. *Antioxidant and Redox Signaling*, **13**, 1535-1548.
- Wu H, Guo J, Chen S, *et al.* (2013) Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **72**, 267–291.
- Xu H, Kulkarni KH, Singh R, *et al.* (2009). Disposition of naringenin via glucuronidation pathway is affected by compensating efflux transporters of hydrophilic glucuronides. *Molecular Pharmaceutics*, **6**, 1703–1715.
- Yang Y, Zhang Z, Li S, *et al.* (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, **92**, 133–147.
- Yáñez JA, Remsberg CM, Miranda ND, *et al.* (2008). Pharmacokinetics of selected chiral flavonoids: hesperetin, naringenin and eriodictyol in rats and their content in fruit juices. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **29**, 63–82.
- Yoshimura M, Sano A, Kamei J-I, Obata A (2009). Identification and quantification of metabolites of orally administered naringenin chalcone in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6432–6437.
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdóttir J, *et al.* (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **69**, 87-94.
- Yu J, Wang L, Walzem RL, *et al.* (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2009–2014.
- Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, *et al.* (2007). Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion to rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **10**, 368–379.

.. *Bibliografía*

Zhao Z, Egashira Y, Sanada H (2004). Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *The Journal of Nutrition*, **134**, 3083–3088.



VIII. ANEXOS

1. Abreviaturas

ABC (*ATP-Binding Cassette*) = familia transportadores ATP-dependientes

ADN = ácido desoxirribonucleico

ATP (adenosine triphosphate) = trifosfato de adenosina

AUC (*area under the curve*) = área bajo la curva

BCS (*biopharmaceutical classification system*) = sistema de clasificación biofarmacéutica

CID (*collision induced dissociation*) = celda de colisión

COMT (*catechol-O-methyltransferase*) = catecol-O- metiltransferasa

CYP450 (*cytochrome P450*) = citocromo P450

DAD (*diodo array detector*) = detector de haz de diodos

CE (*capillary electrophoresis*) = electroforesis capilar

EMA (*European Medicines Agency*) = Agencia Europea del Medicamento

ESI (*electrospray ionization*) = ionización con electrospray

FDA (*Food and Drug Administration*) = Administracion de Alimentos y Medicamentos

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) = Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FAOSTAT (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) = División estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FTMS (*Fourier transform mass spectrometry*) = transformada de Fourier

GC (*gas chromatography*) = cromatografía de gases

GSH (*glutathione*) = glutatión

GSTs (*glutathione-S-transferases*) = glutatión-S-transferasas

HPLC (*high-performance liquid chromatography*) = cromatografía líquida de alta resolución

... *Anexos*

HPLC-MS/MS (*HPLC-tandem mass spectrometry*) = HPLC acoplada a espectrometría de masas en tandem

HPLC-ESI-MS/MS = HPLC acoplada a MS/MS utilizando ESI

IT = *ion trap* = trampa de iones

LADME = Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

LC-ESI-LTQ-Orbitrap (*liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry*) = LC acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con un espectrómetro híbrido de trampa de iones-Orbitrap

LDL (*low density lipoproteins*) = lipoproteínas de baja densidad

MAGRAMA = Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

MRM (*multiple reaction monitoring*) = monitorización de reacción múltiple

MRPs (*multidrug-resistance associated proteins*) = proteínas asociadas a multiresistencia

MS (*mass spectrometry*) = espectrometría de masas

MS/MS (*tándem mass spectrometry*) = espectrometría de masas en tándem

NAR-GLU = naringenin-4-*O*- β -glucurónido y naringenin-7-*O*- β -glucurónido = glucoconjugados de la naringenina

NAR-SULF = naringenin-7-*O*-sulfato y naringenin-4-*O*-sulfato = sulfato derivados de la naringenina

NL (*neutral loss*) = pérdida neutra

OMS = Organización Mundial de la salud

OATPs (*organic anions transporting polypeptides*) = polipéptidos transportadores de aniones orgánicos

PAPS (*3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate*) = 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato

P_{eff} = coeficiente de permeabilidad efectivo

P-gp (*P-glycoprotein*) = P-glicoproteína

PIS = *product ion scan*

Prec = precursor ion scan

Q = cuadrupolo

QqQ = triple cuadrupolo

Q1 = primer cuadrupolo

Q3 = tercer cuadrupolo

QTOF (*quadrupole time of flight*) = espectrómetro híbrido de cuadrupolo-tiempo de vuelo

RMN = resonancia magnética nuclear

ROS (Reactive Oxygen Species) = especies de oxígeno reactivas

SLC = *Solute Carriers*

SULFs (*sulfotransferases*) = sulfotransferasas

ToF = tiempo de vuelo

UDPGA = uridina difosfo-glucurónido

UGTs (*UDP-glucuronosyltransferase*) = UDP-glucotransferasas

UHPLC (*ultra-high-performance liquid chromatography*) = cromatografía líquida de ultra alta resolución

USDA (*U.S. Department of Agriculture*) = Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UV = Ultravioleta

UV-Vis = Ultravioleta-visible

VLDL (*very low-density lipoprotein*) = lipoproteínas de muy baja densidad

WHO/MONICA = The World Health Organization/Monitor Trends in Cardio-vascular Diseases

2. Estudio de la dieta exenta de polifenoles y curva peso/día de los animales.

Para el alimento de los animales previo al estudio de absorción se utilizó una dieta líquida (**Tabla 2.1**) propuesta por Kim *et al.* 1988; Lieber y DeCarli. 1982; Lieber *et al.* 2004 y Mas-Serrano *et al.* 2000), adaptada a las condiciones experimentales (Kim *et al.* 1988 y Mudra y Borchardt, 2010). La dieta analizada por triplicado en el HPLC-MS/MS demostró ausencia de naringenina, ácido clorogénico y quercetina de acuerdo con el cromatograma (**figura 2.1**). Además, los animales no perdieron peso durante la semana de alimentación (**figura 2.2**).

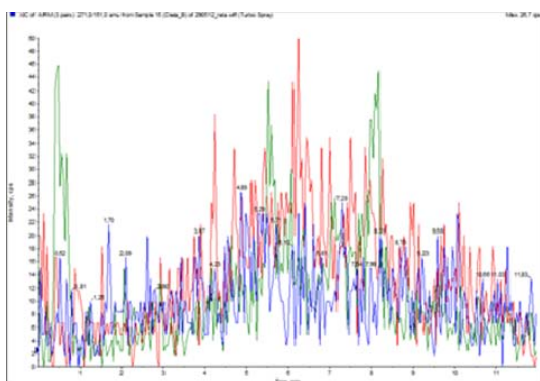


Figura 2.1. Cromatograma dieta semisólida

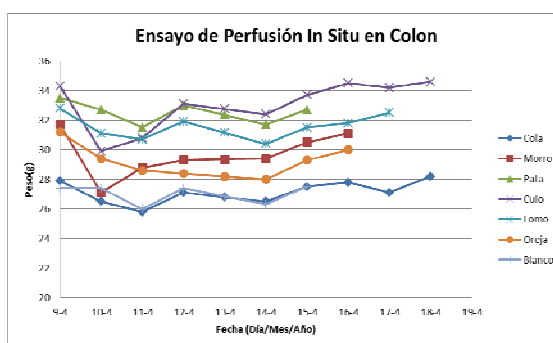


Figura 2.2. Pesos de los ratones alimentados con la dieta durante una semana.

Tabla 2.1. Dieta semisólida

Compuesto	Volumen (1L)	Calorias (Kcal)
Caseina	41.4	165.6
L-Cistina	0.5	2
D,L-Metionina	0.3	1.2
Aceite de maiz	8.5	76.5
Span 20	0.15	0
Vitamin Diet Fortification Mixture	2	0
Hegsted Salt Mixture	10	0
Colina	0.53	0
Sacarina	1	0
Glucidex (Dextrina Maltosa)	115.2	460.8
Sacarosa	74.28	297.12
Nipazol sódico	1	0
CMC	13	0
Agua c.s.p.	1000	0
Total Kcal		1003.22

3. Ácido clorogénico: estabilidad y permeabilidad gástrica

Se realizó un estudio de la absorción del ácido clorogénico en el estómago utilizando el modelo de perfusión *in situ* de un solo paso en ratón. Para ello, previamente se realizó el estudio de la estabilidad a distintos pHs. Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

Estabilidad

Las soluciones de ácido clorogénico resultaron ser estables durante 3h a 37°C a los pHs más básicos, pH 6.2 y 7.2; sin embargo a pH 2 solo fue estable durante las 2 primeras horas, tiempo suficiente para realizar el ensayo de permeabilidad *in situ* en estómago de ratón. La **figura 3.1** muestra los gráficos concentración vs. tiempo a los 3pHs de estudio.

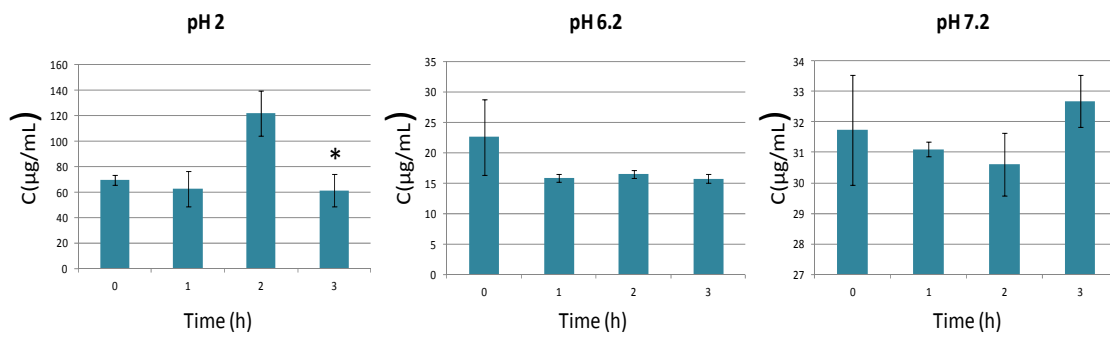


Figura 3.1. Estabilidad de ácido clorogénico a pH 2, 6.2 y 7.2 (* P > 0.05).

Permeabilidad gástrica en ratón del Ácido Clorogénico

En la **tabla 3.1**, se muestran los valores de permeabilidad y el porcentaje de ácido clorogénico absorbido a nivel del estómago. Su absorción a nivel del estómago fue similar a la obtenida para la naringenina en estómago al igual que su P_{eff} (0.00090cm/s vs. 0.000129cm/s), respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con el carácter ácido del producto, que hace que a pH 2 esté mayoritariamente no ionizado, y por tanto en condiciones de máxima permeabilidad.

Tabla 3.1. Valores de *Peff* (cm/s) y porcentaje de ácido clorogénico absorbida en estómago.

Datos Ácido Clorogénico		
Estómago		
Ratón	<i>Peff</i> (cm/s)	%
1	0.00106	59.92
2	0.00080	51.20
3	0.00112	65.96
4	0.00063	45.09
Promedio	0.00090	55.54
SD	0.00023	9.24

4. Comunicaciones en congresos

Comunicación 1: Poster

Título: Absorción gástrica del ácido salicílico por perfusión gástrica de un solo paso en ratón.

Autores: E. Escribano, N. Orrego, M. Martínez and Rosa M. Lamuela-Raventos

Congreso: XI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica: SEFIG 2013. Alicante, España, 2013.



ABSORCIÓN GÁSTRICA DEL ÁCIDO SALICÍLICO POR PERFUSIÓN GÁSTRICA DE UN SOLO PASO EN RATÓN



E. Escribano¹, N. Orrego¹, M. Martínez² and Rosa M. Lamuela-Raventos²

¹ Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. ² Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona

1. Introducción y objetivo

La vía oral es la vía de administración más conveniente y comúnmente utilizada para tratamientos crónicos y/o administraciones frecuentes (1). A su vez, es la mejor aceptada por parte de los pacientes y la de menor coste sanitario. Tras su administración oral, el principio activo debe disolverse en los fluidos del tracto gastrointestinal y atravesar las membranas biológicas accediendo así a la circulación sistémica. A pesar de que de los principios activos son absorbidos mayoritariamente en el intestino delgado, algunos fármacos se absorben también a nivel gástrico (ranitidina (2), aspirina y secobarbital (3)). También está descrita la absorción gástrica de algunos polifenoles, como los ácidos ferúlico (4) y clorogénico (5). En estos casos, la permeabilidad en el estómago juega un papel importante bioidisponibilidad oral de los mismos.

El objetivo del trabajo ha sido poner a punto una técnica de perfusión gástrica de un solo paso en ratón, y estudiar la absorción gástrica del ácido salicílico.

2. Metodología

Ensayos de perfusión gástrica

- La metodología se expone en la Figura 1. Las condiciones de ensayo fueron:
- **Solución de perfusión:** ácido salicílico 11.5mM (6) en pH 2 (297mOsm) con 0.1mg/mL de rojo de fenol (7)(C_{in})
 - **Animales:** ratones macho CD1 (30-35g).
 - **Anestesia:** i.p. mezcla ketamina/xilacina (100 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente)
 - **Flujo:** 0.2mL/min (θ_{in})
 - **Muestras:** cada 10min, durante 5min y hasta 1h.

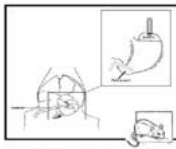


Fig. 1. Técnica quirúrgica gástrica

Estudios de estabilidad

Se estudió la estabilidad de la solución de perfusión de ácido salicílico a pH2 y 37°C, a los tiempos: inicial, 1 y 2 h. El nº de replicados por tiempo: n=5

Técnica analítica

Las concentraciones de ácido salicílico y de rojo de fenol en las muestras biológicas fueron determinadas por HPLC a 237 nm (C_{out}) y por espectrofotometría en medio alcalino a 558 nm, respectivamente.

Análisis de datos

A partir de las C_{out} corregidas en estado de equilibrio estacionario, se estimó para cada ratón, el porcentaje de ácido salicílico absorbido y el coeficiente de permeabilidad (Peff) de acuerdo con la siguiente ecuación (8):

$$Peff = \frac{-\phi_{in} \cdot \ln(C_{out,corr} / C_{in})}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot L} \quad \text{(Ecuación 1), donde}$$

C_{in} and C_{out,corr} son las concentraciones de salida del estómago corregidas por el método gravimétrico (9)y/o por las concentraciones del rojo de fenol, y L la longitud del estómago.

El radio r del estómago fue estimado a partir de la ecuación 2, y asumiendo un volumen cilíndrico de 0.4mL (10):

$$r = \sqrt{\frac{0.4}{\pi \cdot L}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

El flujo neto de agua (NWF) se determinó mediante la ecuación 3, de acuerdo con Issa (8) y Lindahl (11):

$$NWF = \frac{(1 - C_{out} / C_{in}) \cdot \phi_{in}}{L} \quad \text{(Ecuación 3), donde}$$

C_{in} y C_{out} son los flujos (o concentraciones de rojo de fenol) a la entrada y salida del estómago.

3. Resultados y discusión

- **Estabilidad:** - La solución de ácido salicílico (pH 2, 37°C) resultó estable durante 2h (ANOVA, p= 0.448), con lo que el descenso de las concentraciones en el lumen gástrico es atribuible al proceso de absorción.
- **Flujo neto de agua:**
 - Método gravimétrico: 0.798 ± 0.106 mL·h⁻¹·cm⁻¹.
 - Método de rojo de fenol: 0.425 ± 0.220 mL·h⁻¹·cm⁻¹.
- Las relaciones C_{out,corr}/C_{in} vs. tiempo (Figura 2) corregidas por el método gravimétrico resultaron inferiores a las determinadas por el rojo de fenol. Ésto se tradujo en un mayor valor estimado para el coeficiente de permeabilidad (y porcentaje de fármaco absorbido) a partir del método gravimétrico (Tabla1).

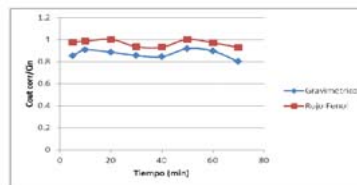


Fig. 2. C_{out,corr}/C_{in} vs. tiempo

Tabla 1. Valores del Peff y porcentaje de fármaco absorbido por los métodos gravimétrico (1) y rojo de fenol (2).

Ratón	Peff_1 (cm/s)	Peff_2 (cm/s)	%_1	%_2
1	0.00071006	0.00061442	41.36	36.97
2	0.00090182	0.00069697	53.98	45.21
3	0.00149319	0.00015621	28.35	11.07
4	0.00028644	0.00011509	21.31	9.18
5	0.00076694	0.00056772	44.34	35.19
6	0.00014749	0.00005321	10.81	4.26
Media	0.000718	0.000367	33.36	23.65
SD	0.000479	0.000289	16.05	17.43

4. Conclusiones

- El estado de equilibrio estacionario fue alcanzado entre los 5-10 min de iniciada la perfusión.
- La determinación del flujo neto de agua por el método del rojo de fenol subestimó dicho proceso, a la vez que aumentó la variabilidad interindividual (%cv 51.91% vs. 13.27).
- El Peff gástrico del ácido salicílico en ratón resultó ser de 7.18·10⁻⁴ ± 4.79 ·10⁻⁴ cm/s. Otros autores (12) hallaron un Peff intestinal para el piroxicam (alta permeabilidad) en ratón del mismo orden (10.21·10⁻⁴ ± 4.11·10⁻⁴ cm/s).
- El porcentaje promedio de ácido salicílico absorbido mediante la técnica de perfusión gástrica ha resultado ser un 33.36 ± 16.05%, similar al hallado por otros autores (6).
- Dado que a mayor tiempo de permanencia del fármaco en el lumen mayor probabilidad de incrementar su absorción, resulta conveniente repetir el ensayo a un menor flujo de perfusión.

5. Referencias

- (1) Lennernäs H y Abrahamsson B. J. Pharm. Pharmacol. 2005; 57: 273-85.
- (2) Rowland, M.; Tozer, T. N. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 4a ed. Filadelfia: Williams & Wilkins, 2011; pp.187.
- (3) Hogben CAM y col. Pet. 1957; 120 (5): 540-45.
- (4) Zhao Z y col. J. Nutr. 2004; 134: 3083-88.
- (5) Lafay S. y col. J. Nutr. 2006; 136(5):1192-97.
- (6) Worland PI. y col. J. Pharm. Sci. 1984; 73 (12): 1755-58.
- (7) Dahan A, y Amidon GL. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009
- (8) Lindahl A. y col. Pharm Res. 1997; 14 (9), 1278-81.
- (9) Sutton SC. y col. AAPS Pharm. Sci. 2001; 3 (3), article 25, 1-5.
- (10) McConnell y col. J. Pharm. Pharm. 2008; 60, 63-70.
- (11) Issa C. y col. AAPS PharmSciTech 2003; 4(2), article 16, 1-6.
- (12) Escribano E. y col. J. Int. J. Pharm. 2012; 436: 472-77.



Comunicación 2: Poster

Título: Influence of formulation on in vitro skin permeation of naringenin.

Autores: Elvira Escribano, M^aJosé García-Celma, Naiara Orrego, Elwira Lason, Malgosia Jaworska, Elzbieta Siora, Rosa M Lamuela-Raventos, Conxita Solans.

Congreso: Skin Forum Annual Meeting. Londres, Inglaterra, 2013.

**INFLUENCE OF FORMULATION ON *IN VITRO* SKIN PERMEATION OF NARINGENIN**

Elvira Escribano^{1,2}, M^aJosé García-Celma^{1,2}, Naiara Orrego¹, Elwira Lason³, Malgosia Jaworska³, Elzbieta Sikora³, Rosa M Lamuela-Raventos⁴, Conxita Solans⁵

^{1,2}Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (Spain). IN₂UB members
³Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Poland.
⁴Department of Nutrition and Food Science-CeRTA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (Spain). CIBER 06/003 Physiopathology of obesity and nutrition (CIBER-OBN)
⁵Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

Skin Forum 13th Annual Meeting
London, UK | 24-28 June 2013

1. INTRODUCTION AND AIM

Naringenin is the predominant flavanone in grapefruit and an important compound in of human diet. As other flavanones, it shows anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antitumor properties after oral administration (Felgines 2000). Moreover, and due to its strong antioxidant activity, it may prevent photo oxidative stress in the skin (Bonina 1996, Saija 1998). There are few studies regarding to the percutaneous absorption of naringenin through human skin, and none of them is performed with a saturated solution of the polyphenol.

The aim of the study was to determine the intrinsic permeation of naringenin through abdominal human skin, and to modulate the permeation according to the design of two formulations: a nano-emulsion (NE) and a nanostructured lipid carrier (NLC).

2. MATERIALS AND METHODS

Formulations

Saturated solution was prepared adding excess of naringenin to PBS pH5.5 at 32°C during 24h under agitation. NE (0.3 wt %) was prepared by stepwise addition of water to a non-ionic surfactant/triglyceride/naringenin mixture at 25°C. The NLC (0.3 wt %) was composed of water, non-ionic surfactant and a beeswax lipid mixture. Naringenin was dissolved in the lipid mixture and NLC formulation was prepared by a high pressure homogenization technique. Stability of NE and NLC obtained was assessed both at 32°C and at 25°C. Samples were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) after 48 hours of preparation. Droplet diameters around 240 nm and 181 nm for NE and NLC respectively, were obtained.

Skin permeation studies

Comparative skin permeation experiments of naringenin from NE and NLC were performed with Franz type-diffusion mounted in the the MicroettePlus[®] system (Hanson Research, USA) (figure 1) and with the follow conditions:

- ❖ **Membrane:** abdominal female human skin (0.4 mm)
- ❖ **Barrier integrity:** TEWL
- ❖ **Donor compartment:** 0.350 mL formulation
- ❖ **Receptor fluid:** ethanol/water (50:50)
- ❖ **Sample collection:** 0.700 mL for 24 h
- ❖ **Temperature:** 32 ± 0.5 °C
- ❖ **Agitation rate:** 400 rpm

Naringenin concentration in the samples was determined by HPLC-UV (290 nm) using gradient conditions



Fig. 1. The MicroettePlus[®] system (Hanson Research)

3. RESULTS AND DISCUSSION

Mean permeation (±SD) profiles vs. time are shown in figure 2. According to the results obtained, naringenin from the saturated solution, showed the highest value of the permeability coefficient ($9.69 \cdot 10^{-2}$ cm/s) compared to the NLC and NE ($0.118 \cdot 10^{-2}$ and $0.018 \cdot 10^{-2}$ cm/s, respectively). Regarding to the fluxes, the highest value was obtained for NLC ($3.55 \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) and the lowest for NE ($0.56 \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$).

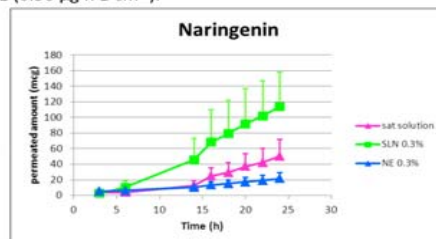


Fig. 2. Skin permeation profiles of naringenin from saturated solution, SLN and NE.

4. CONCLUSIONS

Naringenin had optimal physicochemical properties to cross the stratum corneum, and it is possible to increase or decrease the skin absorption according to the design of the formulation.

5. REFERENCES

1. Felgines C. et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279, G1148-G1154.
2. Bonina F et al. Int J Pharm 1996, 145, 87-94
3. Saija A. et al. Int J Pharm, 1998, 175, 85-94

The authors thank Dr L Asmarats from Clínica Sagrada Familia (Barcelona, Spain) for providing skin samples. Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation within the projects AGL2010-22319-C03-01 and CTQ2011-29336-C03-03 is acknowledged.

Comunicación 3: Poster

Título: Improved characterization of naringenin metabolites from mice stomach using two analytical techniques.

Autores: N. Orrego, E. Escribano, M. Martínez, A. Vallverdú y Rosa M. Lamuela-Raventos.

Congreso: 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical technology. Lisboa, Portugal, 2014.

POLYPHENOL RESEARCH PBP WORLD MEETING IMPROVED CHARACTERIZATION OF NARINGENIN METABOLITES FROM MICE STOMACH USING TWO ANALYTICAL TECHNIQUES

Naiara Orrego¹, Elvira Escribano¹, Miriam Martínez-Huelamo^{2,3}, Anna Vallverdú-Queralt^{2,3} and Rosa M. Lamuela-Raventos^{2,3}

¹ Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (UB), ² Dept. of Nutrition and Food Science-CeRTA, XaRTA, INSA Faculty of Pharmacy (UB), ³ CIBER 06/003 CIBER 06/003 Physiopathology of obesity and nutrition (CIBEROBN) and RETICS RD06/0045/0003. Institute of Health Carlos III.

naiaraorrego@yahoo.es

1. Introduction

Naringenin (NAR), an antioxidant found in high concentration in tomato, is strongly associated with a reduced risk of chronic and cardiovascular diseases and cancer (Zygmunt K, 2010).

Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) is useful for identification and quantification of NAR and its metabolites (Martínez-Huelamo, M, 2012).

The mass spectrometry (MS) techniques, liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) is used for identification of all compounds with the most accurate precision, and allow to identify lower concentration metabolites, because of its greatest sensitivity (Vallverdú-Queralt, 2010).

Aim: Combine both analytical techniques to enhance the knowledge about the metabolic fate of NAR in stomach. Samples of gastric content were obtained after an *in situ* single-pass perfusion technique in mice.

2. Material and methods

Perfusion experiments

Briefly, a solution of 3.5 µg/mL of NAR in pH 2 (267mOsm/kg) with a 0.1mg/mL of Phenol Red at 37°C was perfused (0.16 mL/min) into the stomach of anesthetized CD1 mice (30-35g). Samples were collected at 10 min intervals for 1h 40 min.

Analytical techniques

• **HPLC analysis:** Identification and quantification

Liquid chromatograph

Agilent series 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a quaternary pump and a thermostated autosampler.

Analytical conditions

- Column: 5 µm Luna C₁₈ (Phenomenex, USA)
- Injection volume: 20 µL
- Flow: 0.6 mL / min
- Column temperature: 30 °C
- Mobil phases: - A : H₂O with 0.1% formic acid
- - B : AcN with 0.1% formic acid
- Gradient (t (min), %B (v/v)): (0, 5); (2, 25); (10, 90); (11,100); (12,100); (17, 5);(20, 5).
- Turbo ion spray (negative mode) :
 - Capillary voltage = - 4500 V
 - Nebulizer gas (N₂) = 10 au (arbitrary units)
 - Curtain gas (N₂) = 12 au
 - Entrance potencial (EP) = - 11V
 - Drying gas (N₂) heated to 400°C
 - Declustering potencial (DP)*
 - Focusing potencial (FP)*
 - Collision energy (CE)*

* Optimized to detect phenolics with the highest signals (Table 1)

Table 1. List of metabolites identified in perfusion samples by LC-MS/MS

Compound	t (min)	MS/MS	DP (V)	FP (V)	CE (V)	ED (µg/mL)	LC (µg/mL)
Naringenin*	5.22	271→284	50	190	30	2.99±22 ^a	9.99±10 ^a
Naringenin-4,7-glucuronide*	4.2	447→271	-50	-190	-30	2.51±10 ^a	8.37±10 ^a
Naringenin-sulfate	7.14	351→271	-50	-190	-30		
Phenol red	3.55	193→134	60	300	20	11.3±20 ^a	37±20 ^a
3,4-Hydroxyphenyl propionic acid*	2.97	169→121	20	200	20	0.028	0.128

* Identified with standard

• **LTQ-Orbitrap:** Identification

LTQ Orbitrap

Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK)

- **Equiped** → ESI Source in **negative mode** was used to acquire mass spectra in profile mode with a setting of 30000 resolution at m/z 400
- **Mass range** → From m/z 100 to 1000
- **Data analysis** → Xcalibur software
 - Source voltage = 4kV
 - Sheath gas = 20 (au)
 - Auxiliary gas = 10 (au)
 - Sweep gas = 2 (au)
 - Capillary temperature = 275 °C.

9th World meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Lisbon, Portugal

Liquid chromatograph

Accela (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) equipped with a quaternary pump, a photodiode array detector and a thermostated autosampler.

Analytical conditions

- Column: reversed-phase column Atlantis T3 C18 from Waters (USA)
- Injection volume: 5 µL
- Flow: 0.6350mL / min
- Column temperature : 25 °C
- Mobil phases: - A : H₂O with 0.1% formic acid
- - B : AcN with 0.1% formic acid
- Gradient (t (min), %B (v/v)): (0, 10); (1, 10); (15, 30); (22,50); (28,100); (34, 100);(36, 10).

3. Results

- LTQ-Orbitrap confirmed the presence of NAR, NAR-GLU (Naringenin-4,7-glucuronide), NAR-SULF (Naringenin-sulfate) and 3,4-HPPA and enabled us to identify low-intensity signals corresponding to naringenin glutation, 4-hydroxyhippuric acid, phloroglucinol and naringenin oxidated.

Table 2. List of compound indentified in perfusion samples by Orbitrap

Compound	t (min)	[M+H] ⁺	Acc.mass	mDa	MF
Naringenin	17.37	271	271.0611	0.3	C ₁₅ H ₁₁ O ₅
Naringenin-4,7-glucuronide	7.65	447	447.0923	-2	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁
Naringenin-sulfate	12.2	351	351.018	0.9	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ S
3,4-Hydroxyphenyl propionic acid	4.72	165	165.0957	0.9	C ₉ H ₇ O ₅
Naringenin glutation	8.18	577	577.1371	0.8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁ S
4-Hydroxyhippuric acid	20.88	194	194.0428	0.04	C ₉ H ₇ N ₃ O ₅
Phloroglucinol	8.19	125	125.0264	0.07	C ₇ H ₇ O ₂
Naringenin oxidated	18	265	269.0611	0.3	C ₁₅ H ₉ O ₅

- The chromatogram in MRM mode obtained in the triple quadrupole system revealed the presence of NAR, NAR-GLU, NAR-SULF and 3, 4-HPPA, however low-intensity compounds had not been detected.

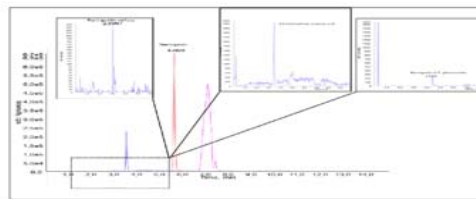


Figure 1. Chromatogram of perfusion sample at 1h 40min after the administration of naringenin solution.

4. Conclusions

1. LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS allowed the identification of 8 metabolites from naringenin digestion and showed 4 metabolites more than using only LC-ESI-MS/MS.
2. The use of the LTQ-Orbitrap was crucial for the identification of naringenin glutation, 4-hydroxyhippuric acid, phloroglucinol and naringenin oxidated, which could not be identified in triple quadrupole system probably due to their low concentration.

5. References

1. Martínez-Huelamo, M. et al. J. Agric. Food Chem., 60, 4542–4549 (2012).
2. Vallverdú-Queralt, A et al. Rapid Commun. Mass Spectrom., 24, 2986-2992 (2010).
3. Zygmunt K., et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 398, 178–183 (2010).

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) for financial support with the projects AGL2010-22319-C03-01 and CTQ2011-29336-C03-03.



Comunicación 4: Poster

Título: Influence of the microbiota on the colonic permeability of naringenin in mice.

Autores: E.Escribano, **N.Orrego**, D. Miñana, D. Soler y Rosa M. Lamuela-Raventós

Congreso: 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical technology. Lisboa, Portugal, 2014.




Influence of the microbiota on the colonic permeability of naringenin in mice

Elvira Escribano¹, Naiara Orrego¹, David Miñana², Daniel Sole³ and Rosa M. Lamuela-Raventós^{4,5}

¹ Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (UB), ²Dept. of Microbiology and Sanitary Parasitology, Faculty of Pharmacy (UB), ³ Dept of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy ⁴ Dept. of Nutrition and Food Science-CeRTA, Faculty of Pharmacy (UB), ⁵CIBER 06/003 Physiopathology of obesity and nutrition (CIBER-OBN).

(eescribano@ub.edu)



1. INTRODUCTION

Flavonoids are phenolic compounds produced by the secondary metabolism of plants. In epidemiologic studies, flavonoid intake has often been linked to a reduced incidence or delayed development of diseases, such as cancer, and cardiovascular and other age-related inflammatory diseases (Tresserra-Rimbau et al 2014). **Naringenin (NAR)** is the predominant flavanone in grapefruit, tomato, and an important compound in of human diet. As other flavanones, it shows antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic activities, and the capacity to diminish blood lipid and cholesterol after oral administration (Xu et al 2009). These benefits in human health should be attributed to the bioavailability of NAR. However, it is reported a very low systemic bioavailability after its oral ingestion (10%) (Xu et al 2009). Bioavailability depends basically on the permeability of the compound but also on how extensive is the intestinal and hepatic metabolism, including also the effect of the microbial enzymes on these processes.

Aims: Study the influence of the microbiota on the colonic permeability of NAR, and also to assess its influence on the intestinal metabolism, using an *in situ* single-pass perfusion technique in mice.

2. METHODOLOGY

In situ single-pass perfusion experiments

Experimental conditions:

- ◆ **Perfusion solution:** 3.5 µg/mL of NAR in pH 7.2 (267mOsm/kg) with a 0.1mg/mL of Phenol Red (PR) at 37°C.
- ◆ **Animals:** 12 male CD1 mice (30-35g), divided in two batches:
 - ◆ Control
 - ◆ Treated with rifaximin (50 mg/kg/day for 5 days) via gastric gavage.
- ◆ **Pre-assay conditions:** diet absent of polyphenols (7 days) and fasted overnight.
- ◆ **Anesthesia:** i.p. ketamine/xylacin (100 mg/kg ; 10 mg/kg, respectively).
- ◆ **Flow rate:** 0.20 mL/min.
- ◆ **Perfusion samples:** Collected at 10 min intervals for 60 min.
- ◆ **Blood samples:** cardiac puncture at 60 min
- ◆ **Bile sample:** Gall bladder collected at the end of the assay.



Figure 1. Colon surgical technique.

Stability studies

The stability of NAR was tested in the perfusion solutions at pH 7.2 at 37°C for 1, 2, and 3h. Number of replicates, n=5.

Analytic technique : HPLC-MS/MS

Agilent series 1100 HPLC instrument.

- **Column:** 5 µm Luna C18 (Phenomenex, USA)
- **Injection volume:** 20 µL
- **Flow:** 0.6 mL /min
- **Column temperature :** 30 °C
- **Mobil phases:** - A : H₂O with 0.1% (v/v) formic acid
- B : AcN with 0.1% (v/v) formic acid
- **Gradient (t (min), %B (v/v)):** (0, 5); (2, 25); (10, 90); (11, 100); (12, 100); (17, 5); (20, 5).
- **Turbo ion spray:** Negative mode with the settings shown in table 1.

Table 1. Settings of turbo ion spray source. CV: Collisium voltage; EP: Entrance Potential; DP: Declustering Potential; FP: Focusing Potential; CE: Collision Energy.

Compound	CV	Nitobulzer gas (N2)	Curtain gas (N2)	Drying gas (N2)	EP	DP	FP	CE
Naringenin	-4500V	30 (arbitrary units)	12 (arbitrary units)	400°C	-11 V	-50	-130	-30
Naringenin-4,7-glucuronide	-4500V	30 (arbitrary units)	12 (arbitrary units)	400°C	-11 V	-50	-130	-30
Naringenin-sulfate	-4500V	30 (arbitrary units)	12 (arbitrary units)	400°C	-11 V	-50	-130	-30

Data analysis

- ◆ **Effective permeability coefficients (P_{eff}) and percentage of absorption (%abs)** were calculated according to equations 1 and 2 respectively, after correcting the outlet concentration following the PR method (Zakeri-Milani 2007).

$$P_{eff} = \frac{-\phi_{in} \cdot \ln \frac{C_{in}}{C_{out}}}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L} \quad \text{Equation 1}$$

$$\%abs = \left[1 - e^{-\frac{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L \cdot P_{eff}}{\phi}} \right] \cdot 100 \quad \text{Equation 2, where}$$

$\phi_{i,j}$ is the flow rate, C_{in} and C_{out} are the respective inlet and corrected outlet concentrations at steady state, R is radius of the mouse gastrointestinal segment (0.14 cm, Masaoka 2006) and L is the length of gastrointestinal .

- ◆ **Metabolites derived from NAR:** the linear trapezoidal method was used to calculate the AUC (area under the lumen concentration curve -normalized by the inlet perfusion concentration of NAR- from time zero until the last sample).

3. RESULTS AND DISCUSSION

- ◆ **Stability:** NAR was stable in the perfusion solution during 2h, time enough to perform the permeation experiments.
- ◆ **Permeability coefficients and metabolites in perfusion samples** are shown in tables 2 and 3, respectively.

Table 2. Permeability coefficients and percentage of absorption (* p<0.05).

	Peffx10 ⁷ (cm/s)± SD	Percentage abs	n
Colon	5.49 ± 1.86 *	18.90 ± 8.66	5
Colon (+Rifaximin)	2.26 ± 0.93	12.41 ± 4.84	5

Table 3. Mean AUC of the metabolites in lumen

	AUC (min) ± SD			
	Naringenin-4,7-glucuronide	Naringenin sulfate	4-Hydroxyhippuric acid	Hippuric acid
Colon	0.079 ± 0.027	2.341 ± 1.380	0.2196 ± 0.0723*	0.140 ± 0.122
Colon+Rifaximine	0.035 ± 0.043	4.207 ± 2.326	0.0715 ± 0.0358	0.052 ± 0.035

(n=6; * p<0.05)

- The microbiota did not affect the levels of the phase 2 metabolites (NAR-GLU and NAR-SULF).
- The microbiota metabolizes the aglycon NAR into hydroxyphenyl propionic acids (Aura 2008) and we have not detected them in the colonic lumen. However, 4-hydroxy propionic acid, 3-phenylpropionic acid, and 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid were found in plasma and bile. Then, their absence in perfusates could be attributed to a rapid absorption of the phenolic acids after its formation.
- The level of metabolites derived from hydroxycinnamic acids such as 4-hydroxyhippuric and hippuric acid decreased in absence of microbiota. Hippuric acid is formed by glycation of benzoic acid (derived from NAR) in the liver (Rechner AR 2004, Aura 2008). In absence of microbiota the levels of benzoic acid should decrease and also the hippuric and 4-hydroxyhippuric acid.

4. CONCLUSIONS

1. The pretreatment with rifaximin reduces the permeability of NAR in large intestine.
2. In general, a decrease in the intestinal metabolites is observed in absence of microbiota.
3. The presence of the microbiota can be considered as a benefit in the disposition of NAR after its oral ingestion

5. REFERENCES

1. Aura, AM. *Phytochem Rev*, 7, 407-429 (2008).
2. Masaoka, Y., Tanaba, T., Kataoba, M. et al. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 240-250 (2006).
3. Rechner, AR., Smith, MA., Kuhnle, G., Gibson, GR. et al. *Free Radical Biol Med*, 36 (2), 212-225 (2004).
4. Tresserra-Rimbau, A.; Rimm, EB, Medina-Reimon, A. *Nutr Metab. Cardiovasc Dis*, (2014). DOI 10.1016 (2014).
5. Xu H., Kulkarnit, K.H., Singh, R. et al. *Mol. Pharm.*, 6 (6), 1703-1715 (2009).
6. Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H. et al. *J. Pharm. Sci.*, 10 (3), 368-379 (2007).

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) for financial support with the projects AGL2010-22319-C03-01 and CTQ2011-29336-C03-03.

Comunicación 5: Poster

Título: Gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin in mice.

Autores: N. Orrego, E.Escribano, J. Queralt Regué, X. Garcia-Sala, Rosa M. Lamuela-Raventós.

Congreso: 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical technology. Lisboa, Portugal, 2014.



1. INTRODUCTION

Naringenin (NAR) is the predominant flavanone in grapefruit, tomato, and an important compound in of human diet. It shows antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic activities, and the capacity to diminish blood lipid and cholesterol after oral administration (Xu et al. 2009). The benefits in human health are related with its oral bioavailability. Bioavailability depends basically on the permeability of the compound but also on how extensive is the intestinal and hepatic metabolism. Some studies have reported the intestinal transport mechanism of NAR and other flavonoids (Chabane 2009), but no studies report the intestinal permeability of NAR, scarce are related to the relevance of the intestinal metabolism on its bioavailability in rats (Xu et al 2009) and any of them are performed in mice.

Aim: Determine the permeability coefficient (Peff) of NAR through the gastrointestinal tract using an *in situ* single-pass perfusion technique in mice and also to evaluate the intestinal first pass effect through the detection and quantification of metabolites in the lumen, bile and plasma.

2. METHODOLOGY

In situ single perfusion experiments.

Experimental conditions:

- **Perfusion solution:** 3.5 µg/mL of NAR in pH 2, 6.2 and/or 7.2 (267mOsm/kg) with a 0.1mg/mL of Phenol Red (PR) at 37°C.
- **Animals:** 6 male CD1 mice (50-55g).
- **Pre-assay conditions:** diet absent of polyphenols (7 days) and fasted overnight.
- **Anesthesia:** i.p. ketamine/xylacin (100 mg/kg; 10 mg/kg, respectively).
- **Flow rate:** 0.20 mL/min (0.16 mL/min for the stomach assays).
- **Perfusion samples:** Collected at 10 min intervals for 60 min.
- **Blood samples:** cardiac punctation at 60 min.
- **Bile sample:** Gall bladder collected at the end of the assay.

An image of the surgical techniques are shown in figure 1.

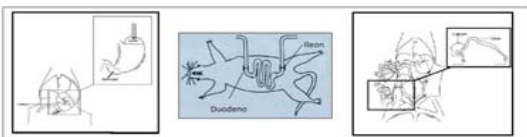


Figure 1. Gastric, small intestine and colon surgical techniques.

Stability studies

The stability of NAR was tested in the perfusion solutions (pH 2, 6.2 and/or 7.2) at 37°C for 1, 2, and 3h. Number of replicates, n 5.

Analytic technique: HPLC-MS/MS

Agilent series 1100 HPLC instrument.

- **Column:** 5 µm Luna C18 (Phenomenex, USA)
- **Injection volume:** 20 µL
- **Flow:** 0.6 mL/min
- **Column temperature:** 30 °C
- **Mobil phases:** - A: H₂O with 0.1% (v/v) formic acid
- B: AcN with 0.1% (v/v) formic acid
- **Gradient (t (min), %B (v/v)):** (0, 5); (2, 25); (10, 90); (11, 100); (12, 100); (17, 5); (20, 5).
- **Turbo ion spray:** Negative mode with the settings shown in table 1.

Table 1. Settings of turbo ion spray source. CV: Collision voltage, EP: Entrance Potential, DP: Declustering Potential, FP: Focusing Potential, CE: Collision Energy.

Compound	CV	Nebulizer gas (NZ)	Curtain gas (NZ)	Drying gas (NZ)	EP	DP	FP	CE
Naringenin	-4500V	10 (arbitrary units)	12 (arbitrary units)	400°C	-11 V	-50	-190	-30
Naringenin-4,7-glucuronide	-4500V	10 (arbitrary units)	12 (arbitrary units)	400°C	-11 V	-50	-190	-30
Naringenin-sulfate	-4500V	10 (arbitrary units)	12 (arbitrary units)	400°C	-11 V	-50	-190	-30

Data analysis

- **Effective permeability coefficients (Peff) and percentage of absorption (%abs)** were calculated according to equations 1 and 2 respectively, after correcting the outlet concentration following the PR method (Zakeri-Milani 2007).



9th World meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Lisbon, Portugal

$$P_{eff} = \frac{-\phi_{in} \cdot L \cdot \ln \frac{C_{in}}{C_{out}}}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L}$$

Equation 1

$$\%abs = \left[1 - e^{-\frac{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L}{\phi} \cdot P_{eff}} \right] \cdot 100$$

Equation 2, Where

ϕ_{in} is the flow rate, C_{in} and C_{out} are the respective inlet and corrected outlet concentrations at steady state, R is radius of the mouse gastrointestinal segment and L is the length of gastrointestinal segment after completion of the perfusion experiment.

- For **metabolites**, the linear trapezoidal method was used to calculate the AUC (area under the lumen concentration curve-normalized by the inlet perfusion concentration of NAR- from time zero until the last sample).

3. RESULTS AND DISCUSSION

- **Stability:** NAR was stable in the time required to perform the permeation experiments (3h) (P>0.05, ANOVA test).
- **Permeability coefficients** are shown in table 2.

- NAR was absorbed along the gastrointestinal tract but in a lower degree in stomach.
- The permeability of NAR was maintained throughout the small and large intestine and no significant differences were found.

Table 2. Permeability coefficients and percentage of absorption.

	Peffx10 ⁴ (cm/s)±SD	Percentage abs	n
Stomach	3.04 ± 0.89	23.69 ± 5.54	4
Small intestine	7.80 ± 1.54 ^a	93.94 ± 5.90 ^{a,b}	4
Colon	5.49 ± 1.86	18.90 ± 8.66	5

^a p<0.05 with stomach; ^b p<0.05 with colon

- With regard to the intestinal first pass effect, the main metabolites found in perfusion samples were naringenin sulfate (NAR-SULF) and naringenin-4,7-glucuronide (NAR-GLU). The mean AUC values for these metabolites in each gastrointestinal segment are shown in Figure 2.

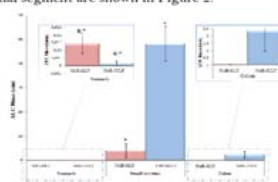


Figure 2. AUC of NAR-GLU and NAR-SULF in stomach, small intestine and colon.

- NAR-SULF was found neither in plasma nor in bile. NAR-GLU was present in plasma but in a low percentage respect to the inlet NAR

4. CONCLUSIONS

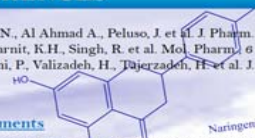
1. NAR was absorbed in the same order in small intestine and colon, and its phase 2 metabolites were excreted the most in small intestine.
2. The NAR-SULF is the main metabolite found in small intestine and colon.
3. NAR shows high intestinal permeability and the low bioavailability (10%) (Xu et al 2009) should be attributed to other factors, such as a high intestinal first pass effect.

5. REFERENCES

1. Chabane, M.N, Al Ahmad A., Peluso, J et al. J. Pharm. Pharm., 61, 1473-1483 (2009).
2. Xu H., Kulkarnit K.H., Singh, R. et al. Mol. Pharm. 6 (6), 1705-1715 (2009).
3. Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H. et al. J. Pharm. Sci., 10 (3), 368-379 (2007).

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) for financial support with the projects AGL2010-22319-C03-01 and CTQ2011-29356-C03-03.



Comunicación 6: Poster

Título: In vitro skin permeation of an antioxidant from Nanostructured Lipid Carriers.

Autores: N.Orrego, M^a Jose García-Celma, E.Lawson, M. Jaworska, E.Sikora, RM. Lamuela-Raventós, C. Solans, E. Escribano.

Congreso: SISENA JORNADA of IN²UB. Facultad de Química. Barcelona, 2014.



IN VITRO SKIN PERMEATION OF AN ANTIOXIDANT FROM NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS

N. Orrego ¹, M.J. García-Celma ^{1,2,6}, E. Lason ³, M. Jaworska ³, E. Sikora ³,
RM. Lamuela-Raventós ⁴, C. Solans ^{5,6}, E. Escribano ^{1,2}

¹Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (Spain). ²IN²UB members

³Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Poland.

⁴Department of Nutrition and Food Science-XARTA, INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (Spain). CIBEROBN Physiopathology of obesity and nutrition (CIBER-OBN)

⁵Institute for Advanced Chemistry of Catalonia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQAC-CSIC), Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

⁶Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Barcelona, Spain



1. INTRODUCTION AND AIM

T-2357 is an antioxidant present in grapefruit and an important compound of human diet. Moreover, as other antioxidants, it shows anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antitumor properties after oral administration¹ and due to its strong antioxidant activity, it may prevent photooxidative stress in the skin.^{2,3} It shows favourable physicochemical properties for dermal delivery, but its low hydro solubility makes difficult its formulation. In this sense, nanostructured lipid carriers (NLC) can be useful to encapsulate lipophilic compounds like this compound.⁴

The aim of the study was to design a topical formulation containing T-2357 and to study the influence of the active concentration in the formulation by means of an *in vitro* percutaneous study through human skin.

2. MATERIALS AND METHODS

Formulations

Saturated solution was prepared adding excess of the active to PBS pH5.5 at 32°C during 24h under agitation.

NLC was composed of water, non-ionic surfactant and a beeswax lipid mixture. NLC formulation was prepared by a high pressure homogenization technique and T-2357 was dissolved in the lipid mixture. The concentrations of the active in the formulations were 0.3% and 1% wt.

Stabilities of NLCs were assessed both at 32°C and at room temperature. Samples were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) after 48 hours of preparation.

Skin permeation studies

Comparative skin permeation experiments of T-2357 from NLC were performed with Franz type-diffusion mounted in the the MicroettePlus[®] system (Hanson Research, USA) and with the follow conditions:

- ◆ Membrane: abdominal human skin (0.4 mm)
- ◆ Barrier integrity: TEWL
- ◆ Donor compartment: 0.350 mL formulation
- ◆ Receptor fluid: ethanol/water (50:50)
- ◆ Sample collection: 0.700 mL for 24 h
- ◆ Temperature: 32 ± 0.5 °C
- ◆ Agitation rate: 400 rpm

T-2357 concentration in the samples was determined by HPLC-UV (290 nm) using gradient conditions

3. RESULTS AND DISCUSSION

Stable, antioxidant-loaded NLC with droplet diameters around 334 nm and 181 nm for NLC 1% and NLC 0.3% wt. respectively, were obtained.

Mean permeation profiles vs. time are shown in figure 1. The active from the saturated solution, showed the highest value of the permeability coefficient (0.1065 ± 0.050 cm/s) compared to the NLC ($0.12 \cdot 10^{-2} \pm 0.3 \cdot 10^{-2}$ and $0.05 \cdot 10^{-2} \pm 0.02 \cdot 10^{-2}$ cm/s for 0.3% and 1%, respectively). Regarding to the fluxes, the increment in loading (0.3% wt. vs. 1% wt.) did not increase significantly ($p > 0.05$) their values.

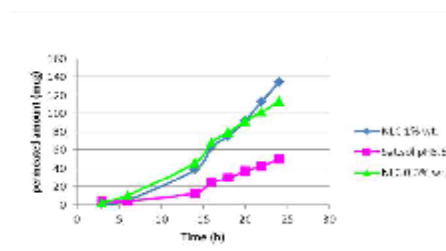


Fig. 1. Skin permeation profiles.

4. CONCLUSIONS

T-2357 had adequate physicochemical properties to cross the stratum corneum, and the developed NLC formulations allowed include higher doses of T-2357 increasing the permeated amount at 24h (data not shown).

5. REFERENCES

- ¹ C. Felgines et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279, G1148-G1154 (2000).
- ² F. Bonina et al. Int J Pharm., 143, 87-94 (1996).
- ³ A. Saija, et al. Int J Pharm. 175, 83-94 (1998).
- ⁴ RH. Müller et al. Adv. Drug Deliv. Rev., 59, 522-530 (2007).

The authors thank Dr L Asmaratz from Clínica Sagrada Família (Barcelona, Spain) for providing skin samples. Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation within the projects AGL2010-22319-C03-01, CTQ2011-29336-C03-03 is acknowledged.

Comunicación 7: Poster

Título: Estudio del efecto sinérgico en la permeabilidad de la naringenina y la quercetina

Autores: N. Orrego-Lagarón, M. Martínez-Huélamo, MR. Lamuela-Raventos, E. Escribano.

Congreso: XII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FARMACIA INDUSTRIAL Y GALÉNICA. Barcelona, España, 2015.



Estudio del efecto sinérgico en la permeabilidad de la naringenina y la quercetina

N. Orrego-Lagarón¹, M. Martínez-Huélamo^{2,3}, R.M. Lamuela-Raventos^{2,3}, E. Escribano¹

¹Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, ²Dpto. Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, ³CIBERORN, Instituto de Salud Carlos III.



1. Introducción

La quercetina (Q) y la naringenina (NAR) son polifenoles del tomate, con efecto sobre el metabolismo lipídico, cardioprotectores, anticancerígenos y antiinflamatorios (1-2). Efectos beneficiosos que suelen estar relacionados con su biodisponibilidad tras su ingesta. Estudios recientes han puesto de manifiesto su baja biodisponibilidad oral depende básicamente, de la permeabilidad intestinal del principio activo, de su solubilidad, y de los procesos de eliminación por secreción intestinal, y por efectos de primer paso intestinal y hepático. Hay pocos estudios acerca la permeabilidad de la NAR (4, 5) y/o de la Q (6,7) en intestino delgado. Por otro lado, estudios previos han puesto de manifiesto que al administrar dos flavonoides simultáneamente se potencia la actividad por efecto sinérgico entre ambos, como es el caso de la capacidad antioxidante (8).

Objetivo: determinar mediante un ensayo de perfusión intestinal *in situ* en ratón, la permeabilidad intestinal (Peff) de la NAR y la Q en administración separada y conjunta, con el fin de evaluar un potencial efecto sinérgico en la absorción.

2. Métodos

Técnica analítica: HPLC-MS/MS
 HPLC-MS/MS (Agilent serie 1100):
 • **Fases móviles:** - A: H₂O con 0.1% (v/v) ácido fórmico, - B: AcN con 0.1% (v/v) ácido fórmico.
 • **Método:** a gradiente.
 • **Turbo ion spray:** Modo negativo con los ajustes de la tabla 1 (9).

Tabla 1. Ajustes de la fuente iónica. CV: Collision voltage; EP: Entrance Potential; DP: Declustering Potential; FFP: Focusing Potential; CE: Collision Energy.

Comp.	CV	GN (N ₂)	CG (N ₂)	DG (N ₂)	EP	DP	FP	CE
NAR	-4500	10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-50	-190	-30
Q	-4500	10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-10 V	-50	-210	-20

Estudio de estabilidad
 Se estudio la estabilidad de la Q y la NAR en solución de perfusión (pH 6.2) a 37°C durante 3h y se guardaron a -20°C hasta su análisis por HPLC-MS/MS.

Perfusión intestinal *in situ* en ratón.
 Condiciones experimentales:

- 3 Grupos según la solución de perfusión (Cin):
 - Grupo 1: Solución de perfusión 3.5 µg/mL de NAR (10).
 - Grupo 2: Solución de perfusión 0.003 µg/mL de Q (11).
 - Grupo 3: Solución de perfusión 3.5 µg/mL de NAR y 0.003 µg/mL de Q.
- Todas soluciones isoosmóticas de 267mOsm/kg y con una concentración de 0.1mg/mL de Rojo de Feno1 a 37°C (12).
- **Animales:** 5 ratones macho CD1(30-35g) por grupo.
- **Condiciones previas:** dieta ausente de polifenoles (7 días) y ayunas las 12h previas al ensayo con acceso libre a agua.
- **Anestesia:** i.p. ketamina/xylacina (100 mg/kg ; 10 mg/kg, respectivamente).
- **Condiciones del ensayo:**
 - Obstrucción del conducto biliar.
 - Canulación del duodeno (orificio de entrada) y del íleon (orificio de salida).
 - Al final del experimento, el animal fue eutanasiado y se midió la longitud del intestino (L).
- **Flujo:** 0.20 mL/min (01n).
- **Muestras de perfusión:** Recogida a los 5min y cada 10min hasta 1h (Cout). (Centrifugación a 9000 r.p.m y almacenamiento a -20°C hasta el análisis).



Figura 1. Técnica quirúrgica para el ensayo de perfusión intestinal *in situ*.

Análisis de datos
 • **Coefficiente de permeabilidad (Peff) y porcentaje de absorción (%abs)** se calcularon a partir de las Cout corregidas en el estado estacionario de acuerdo con la ecuación 1 y la ecuación 2, respectivamente(13).

$$P_{eff} = \frac{-\phi_{in} - \ln \frac{C_{in}}{C_{out}}}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\%_{abs} = \left(1 - e^{-\frac{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L \cdot P_{eff}}{\phi}} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2, donde}$$

Comunicación 8: Poster

3. Resultados y discusión

- **Estabilidad:** Las soluciones de Q a pH 6.2 resultaron ser estables durante 3 h (ANOVA, p= 0.129), sin embargo las soluciones de NAR a pH 6.2 solo fueron estables durante 2 h, tiempo suficiente para realizar el ensayo.
- **Coefficientes de permeabilidad y porcentaje absorbido:**
 - Los valores de Peff no sufrieron cambios significativos (p >0.05) cuando se administran por separado o de forma conjunta, sin embargo, se observa como la permeabilidad de la Q tiene una tendencia a aumentar cuando se administra conjuntamente con la NAR (Tabla 2).

a)			b)		
Peff *10 ⁻⁴ (cm/s)	NAR	NAR+Q	Peff *10 ⁻⁴ (cm/s)	Q	Q+NAR
R1	8.71	7.79	R1	1.48	1.03
R2	7.95	7.58	R2	1.48	1.86
R3	7.44	3.61	R3	1.12	1.72
R4	6.75	10.07	R4	0.49	1.77
R5	ND	5.71	Media	1.18	1.59
R6	ND	7.27	DS	0.47	0.38
Media	7.80	7.01			
DS	1.54	2.22			

- Esta tendencia se traduce en un aumento significativo en el porcentaje de Q absorbido en coadministración con NAR (29.57 ± 10.27% vs. 47.46 ± 4.26%, respectivamente (Tabla 3).

a)			b)		
Absorción %	NAR	NAR+Q	Absorción %	Q	Q+NAR
R1	97.15	93.99	R1	31.30	26.79
R2	97.78	93.23	R2	41.10	44.52
R3	91.27	87.01	R3	29.75	43.18
R4	93.06	94.08	R4	16.13	50.24
R5	ND	89.27	R5	ND	51.91
R6	ND	93.94	Media	29.57*	47.46
Media	93.94	91.92	DS	10.27	4.26
DS	5.90	3.03			

4. Conclusiones

1. La NAR muestra una elevada permeabilidad intestinal y porcentaje de absorción, con lo cual su baja biodisponibilidad debe atribuirse a otros factores como el metabolismo de primer paso intestinal o hepático (4).
2. La Q muestra una permeabilidad intestinal y porcentaje de absorción medios; su baja biodisponibilidad, puede atribuirse a su dificultad de atravesar la membrana intestinal unida a un potencial metabolismo de primer paso.
3. La administración conjunta de ambos compuestos, no producen cambios significativos en los coeficientes de permeabilidad intestinales. Pero en el caso de la Q se observa un incremento en el valor de este parámetro.
4. El porcentaje de Q absorbido cuando se administra conjuntamente con la NAR aumenta significativamente, respecto a cuando ésta se administra sola. Posteriores estudios realizados a una dosis más alta de Q son necesarios para confirmar esta tendencia.

5. Referencias

- 1) Boots, A.W. et al. Eur. J. Pharm. 2008, 585: 325-327.
- 2) Erlund J. et al. Nutr Res. 2004, 24: 851-874.
- 3) Boonprawa R. et al. Biochem Pharmacol. 2014, 89: 287-299.
- 4) Xu H. et al. Mol Pharm. 2009, 6(6): 1703-1715.
- 5) Chabane M et al. J Pharm Pharm. 2009, 61: 1473-1483.
- 6) Crespy Y et al. Gastrointest. Liver Physiol. 1999, 440: G120-G126.
- 7) Crespy Y et al. J. Nutr. 2001, 131: 2109-2114.
- 8) Silberberg, M. et al. Life Sci. 2005, 77: 3156-3167.
- 9) Martínez-Huélamo, M. et al. J. Agric. Food Chem. 2012, 60: 4542-4549.
- 10) Worland P.J. et al. J. Pharm. Sci. 1984, 73 (12): 1755-1758.
- 11) Tokusugifu, O et al. Acta Chromatogr. 2003, 13: 199-207.
- 12) Sutton SC. Et al. AAPS Pharm. Sci. 2001, 3 (3): 1-5.
- 13) Varma MVS, Panchagnula R. J Pharm Sci 2005, 94: 1694-1704.

Agradecimientos:
 Este trabajo ha sido apoyado por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación (AGL2010-22319-Co3, AGL2013-49083-C3-1-R) y la Generalitat de Catalunya (2014 SGR 773).



Título: Study of the synergic effect of naringenin and quercetin in their permeability and metabolic fate

Autores: N. Orrego-Lagarón, M. Martínez-Huélamo, MR. Lamuela-Raventos, E. Escribano.

Congreso: 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery. Reims, Francia, 2015.



Study of the synergic effect of naringenin and quercetin in their permeability and metabolic fate



N. Orrego-Lagarón¹, M. Martínez-Huélamo^{2,3}, R.M. Lamuela-Raventos^{2,3}, E. Escribano-Ferrer^{1,3}
¹Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona. ²Dept. of Nutrition and Food Science-CERIA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona. ³CI3BER 06/003 Physiopathology of obesity and nutrition (CI3BER-OBN).

1. Introduction

Naringenin (NAR) and quercetin (Q) are two of the major flavonoids in tomato with reported health-promoting properties against many diseases, in particular in cancer and oxidative stress-related chronic diseases (Lee Hülz et al. 2008), cardio protective and lipid metabolism effects (Erlund et al. 2004; Boots et al. 2008) and antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities (Xu et al. 2009). These benefits in human health are assumed to be related with their oral bioavailability. Low bioavailabilities of both flavonoids have been reported: 10% for NAR (Xu et al. 2009) and 0.04-0.1% for Q (Boonpawa et al. 2014) after oral administration. Bioavailability depends basically on the permeability of the compound but also on how extensive is the intestinal and hepatic metabolism, among others. Moreover, previous studies reported that flavonoids could interact together and these interactions could exhibit several properties, hence synergistic antioxidative properties or efficient competitions between them for metabolic enzymes (Silberberg et al. 2005).

Aim: study the intestinal permeability of NAR and Q, and to study the influence of their co-administration in their absorption and intestinal first pass metabolism.

2. Methods

Analytical methods: HPLC-MS/MS

- **Mobile phases** - A: H₂O with 0.1% (v/v) formic acid.
 - B: Acetonitrile 0.1% (v/v) formic acid.
- **Method:** increasing linear gradient (v/v) of B.
- **Flow:** 600 µL min⁻¹.
- **Turbo ion spray:** negative mode with the settings in Table 1.

Comp.	CV	G _N (N ₂)	CG (N ₂)	DG (N ₂)	EP	DP	FP	CE
NAR	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-50	-190	-30	
Q	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-10 V	-50	-210	-30	
NAR-GLU	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-30	-200	-30	
NAR-SULF	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-50	-190	-30	
Q-GLU	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-30	-200	-30	
Q-SULF	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-50	-210	-30	
ISOH-GLU	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-60	-210	-30	
ISOH-SULF	-4500 10 (u.a)	12 (u.a)	400°C	-11 V	-60	-210	-30	

Table 1. Settings of turbo ion spray source. CV: Collision voltage; EP: Entrance Potential; DP: Declustering Potential; FP: Focusing Potential; CE: Collision Energy. NAR-GLU: Naringenin-glucuronide; NAR-SULF: Naringenin-sulfate; Q-GLU: Quercetin-glucuronide; Q-SULF: Quercetin-sulfate; ISOH-GLU: Isorhamnetin-glucuronide; ISOH-SULF: Isorhamnetin-sulfate

Stability studies

The stability of the compounds was tested in the perfusion solutions (pH 6.2) at 37°C for 1, 2, and 3h. The concentrations at a range of times were compared using an ANOVA-test (α 0.05).

Perfusion experiments

- **Animals:** Male CD1 mice (30-35g) divided in 3 groups of mice according to the perfusion solution (C_{in}):
 - Group 1: Perfusion solution 3.5 µg/mL of NAR.
 - Group 2: Perfusion solution 0.003 µg/mL of Q.
 - Group 3: Perfusion solution 3.5 µg/mL of NAR and 0.003 µg/mL of Q.

Every isosmotic solution contained 0.1 mg/mL of phenol red.

- **Previous conditions:** mice were fed during one week with a diet absent of polyphenols.
- **Anesthesia:** i.p. ketamine/xylacin (100 mg/kg; 10 mg/kg, respectively).
- **Assay conditions:**
 - ☐ The biliary duct was tied.
 - ☐ A segment of small intestine was isolated and cannulated (L).
- **Flow:** 0.20 mL/min (0.1m).
- **Samples:**
 - ☐ Perfusion samples; collected at 10 min intervals for 60 min.
 - ☐ Blood sample; at 60 min with cardiac puncture.
 - ☐ Bile sample; the gall bladder was collected at the end of the assay.

An image of the surgical technique is shown in figure 1:

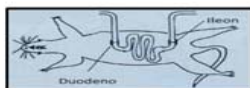


Figure 1. Intestinal surgical technique.

Data analysis

Effective permeability coefficients (P_{eff}) and percentage of absorption (%_{abs}) were calculated according to equations 1 and 2 respectively, after correcting the outlet concentration following the phenol red method (Zakeri-Milani 2007).

$$P_{eff} = \frac{-\phi_{in} \cdot L_{in} \cdot C_{in}}{2\pi \cdot R \cdot L \cdot C_{out}}$$

Equation 1

$$\%_{abs} = \left[1 - e^{-\frac{2\pi \cdot R \cdot L \cdot P_{eff}}{\phi}} \right] \cdot 100$$

Equation 2, where

ϕ_{in} is the flow rate, C_{in} and C_{out,corr} are the respective inlet and corrected outlet concentrations at steady state, R is radius of the intestine.

Area under the curve (AUC)

For the metabolites, the linear trapezoidal method was used to calculate the area under the lumen concentration curve (normalized by the inlet perfusion concentration of NAR and/or Q) from time zero until the last sample, using the WinNonlin[®] software v6.3 (2012 Certara, L.P.)

3. Results and discussion

- **Stability:** Q was stable for 3h (p= 0.129) and NAR was stable for 2h, time enough to perform the permeation experiments.
- **Permeability study:**

- ☐ The permeability and % absorption of NAR did not change when administered alone or co-administered with Q.
- ☐ Regarding Q, it showed a tendency to increase its permeability and percentage of absorption when administered together with NAR.

	P _{eff} *10 ⁻⁴ (cm/s)± SD	% Absorption	n
NAR Assay	7.80 ± 1.54	93.94 ± 5.99	4
NAR + Q assay	7.01 ± 2.22	91.92 ± 3.03	6
Q Assay	1.18 ± 0.47	29.57 ± 10.27 *	4
Q + NAR Assay	1.59 ± 0.38	47.46 ± 4.26	4

Table 2. P_{eff} values and percentage of absorption of NAR and Q in the different assays (*P<0.05 t-test).

- ☐ With regard to the intestinal first pass effect, the main metabolites found in the lumen were glucuronides and sulfates (tables 3 and 4). An increase in AUC (p<0.05) was observed for NAR-metabolites in co-administration with Q, and the opposite was observed for Q.

Metabolites from Naringenin	AUC (min)	
	NAR assay	NAR + Q assay
Naringenin-glucuronide	4.07 ± 1.47*	10.63 ± 2.03
Naringenin sulfate	48.31 ± 3.58*	70.04 ± 5.13

Table 3. Mean AUC (± SD) of NAR metabolites in the two assays (*P<0.05 t-test).

Metabolites from Quercetin	AUC (min)	
	Q assay	NAR + Q assay
Quercetin-glucuronide	11.31 ± 4.53	ND
Quercetin-sulfate	152.70 ± 15.84 *	46.60 ± 9.83
Isorhamnetin-glucuronide	242.40 ± 43.92	145.20 ± 92.57
Isorhamnetin-sulfate	668.50 ± 342.60	8312 ± 6604

Table 4. Mean AUC (± SD) of Q metabolites in the two assays (*P<0.05 t-test).

4. Conclusions

1. NAR showed a high intestinal permeability and percentage of absorption, and not affected by the co-administration of Q.
2. Q shows a medium intestinal permeability and percentage of absorption, and its administration together with NAR seems to increase its absorption. A thorough study is needed to confirm this trend.
3. The amount of sulfates in intestinal lumen was higher than the glucuronides for both polyphenols. For NAR the co-administration with Q led to an increase of these metabolites, and the opposite occurred for Q.
4. For Q, the mixed conjugate isorhamnetin-sulfate was the main metabolite obtained in the intestinal lumen.

5. References

- 1) Lee-Hülz, Y.V. et al. Food Chem. Toxicol. 2008, 46: 2128-2134.
- 2) Erlund I. et al. Nutr Res. 2004, 24: 851-874.
- 3) Boots, A.W. et al. Eur. J. Pharm. 2008, 585: 325-327.
- 4) Xu H. et al. Mol Pharm. 2009, 6(6): 1703-1715.
- 5) Boonpawa R. et al. Biochem Pharmacol. 2014, 89: 287-299.
- 6) Silberberg, M. et al. Life Sci. 2005, 77: 3156-3167.
- 7) Zakeri-Milani, P. et al. J Pharm Sci. 2007, 10 (3): 368-379.

Acknowledgements:

This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2010-22319-C03, AGL2013-49083-C3-1-R), CI3BEROBN and by the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 773).



Comunicación 9: Poster

Título: Co-administration of naringenin and quercetin in mice, study on the effect in their absorption and metabolism

Autores: **N. Orrego-Lagarón**, E. Escribano-Ferrer, M. Martínez-Huélamo, P. Quifer-Rada, RM Lamuela Raventós.

Congreso: 7th International Conference on Polyphenols and Health. Tours, Francia, 2015.

7th International Conference on Polyphenols and Health **Co-administration of naringenin and quercetin in mice: study on the effect in their absorption and metabolism** UNIVERSITAT DE BARCELONA

N. Orrego-Lagarón¹, E. Escribano-Ferrer^{1,3}, M. Martínez-Huélamo^{2,3}, RM. Lamuela-Raventós^{2,3}.

¹Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), University of Barcelona. ²Dept. of Nutrition and Food Science-CeRTA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona. ³CIBER 06/003 Physiopathology of obesity and nutrition (CIBEROBN).

1. Introduction

Naringenin (NAR) and quercetin (QUER) are two of the major flavonoids in tomato with reported health-promoting properties against many diseases. The benefits in human health are assumed to be related with their oral bioavailability. However low bioavailability has been reported for both: 10% for NAR (1) and 0.04-0.1% for QUER (2) after oral administration. Bioavailability depends basically on the permeability of the compound but also on how extensive is the intestinal and hepatic metabolism. When there is a co-administration a synergistic effect could appear related to a competition between them for membrane transporters or metabolic enzymes, causing changes on their absorption and metabolism.

Aim: study the influence of their co-administration in their absorption and intestinal first pass metabolism using an *in situ* intestinal perfusion technique.

2. Methods

Analytical methods:

UPLC-ESI-MS/MS: Quantification of the aglycones and its metabolites.

- **Mobile phases** - A : H₂O with 0.1% (v/v) formic acid. - B : Acetonitrile 0.1% (v/v) formic acid.
- **Method:** increasing linear gradient (v/v) of B.
- **Flow:** 600 µL min⁻¹.
- **Turbo ion spray:** negative mode with the settings in Table 1.

Table 1. Settings of turbo ion spray source. CV: Collisional voltage; EP: Entrance Potential; DP: Declustering Potential; FP: Focusing Potential; CE: Collision Energy. NAR-GLU: Naringenin-glucuronide; NAR-SULF: Naringenin-sulfate; QUER-GLU: Quercetin-glucuronide; QUER-SULF: Quercetin-sulfate; QUER-diGLU: Quercetin-diglucuronide; ISORH: Isohammetin; ISOHR-GLU: Isohammetin-glucuronide; ISOHR-SULF: Isohammetin-sulfate. * Quantified with standard.

Compound	RT(min)	MS/MS	DP (V)	FP (V)	CE (V)	EP (V)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
NAR*	3.91	273→193	90	-900	-90	0	0.00235	0.008313
NAR-GLU*	2.63	447→272	90	-900	-90	0	0.009725	0.003238
NAR-SULF*	4.86	323→272	90	-900	-90	0	---	---
NAR-O-SULF-O-GLU*	2.61	527→447	90	-900	-90	0	---	---
QUER*	3.11	301→193	60	-200	-30	0	0.0438	0.0093
QUER-GLU*	2.26	477→301	90	-900	-90	0	0.00342	0.0142
QUER-SULF*	5.39	351→272	60	-200	-30	0	---	---
QUER-diGLU*	2.39	651→477	90	-900	-90	0	---	---
ISORH*	3.66	383→193	60	-200	-30	0	0.172	0.574
ISOHR-GLU*	2.68	498→315	60	-200	-30	0	---	---
ISOHR-SULF*	5.07	395→315	60	-200	-30	0	---	---

Perfusion experiments

- **Animals:** Male CD1 mice (30-35g) divided in 3 groups of mice according to the perfusion solution (Cin):
 - **Group 1:** Perfusion solution 3.5 µg/mL of NAR.
 - **Group 2:** Perfusion solution 2.36 µg/mL of QUER.
 - **Group 3:** Perfusion solution 3.5 µg/mL of NAR and 2.36 µg/mL of QUER.

Every isoosmotic solution contained 0.1 mg/mL of phenol red.

- **Previous conditions:** mice fed for a week with a diet absent of polyphenols.
- **Anesthesia:** i.p. ketamine/xylacin (100 mg/kg; 10 mg/kg, respectively).
- **Assay conditions:**
 - The biliary duct was tied.
 - A segment of small intestine was isolated and cannulated (L).
- **Flow:** 0.20 mL/min (Øin).
- **Samples:**
 - Perfusion samples: collected at 10 min intervals for 60 min.
 - Blood sample: at 60 min with cardiac puncture.
 - Bile sample: gall bladder collected at the end of the assay.



An image of the surgical technique is shown in figure 1:

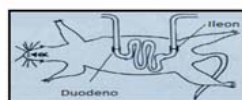


Figure 1. Intestinal surgical technique.

Data analysis

- **Percentage of absorption:** calculated according to equation 1 (3).

$$\%_{abs} = \left[1 - e^{-\frac{2\pi \cdot R \cdot L}{\phi} \cdot Peff} \right] \cdot 100$$

Equation 1, where

$$Peff = \frac{-\phi_{in} \cdot Cin - Cout}{2\pi \cdot R \cdot L \cdot C_{out}}$$

ϕ_{in} is the flow rate, Cin and Cout are the respective inlet and corrected outlet concentrations (phenol red method) at steady state, and R is radius of the intestine.

3. Results and conclusions

- Both naringenin and quercetin showed a decrease on its absorption when were administered together (94.82 ± 3.15% to 74.04 ± 6.57% for NAR and 85.02 ± 1.37% to 65.48 ± 6.15% for QUER).

- The concentration of metabolites found in perfusion samples was higher in the co-administration.

- In plasma and bile samples the number of metabolites identified were also higher (Tables 2 and 3).

Table 2. Mean percentage (%) and standard deviation (SD) of NAR metabolites found in plasma and the bile in the NAR alone and co-administered assay.

Metabolites	PLASMA		BILE POOL	
	Naringenin mean (%)	Naringenin + Quercetin SD	Naringenin mean (%)	Naringenin + Quercetin SD
NAR-GLU	23.15	8.57	43.78	7.21
NAR-SULF	-----	-----	-----	-----
NAR-O-SULF-O-GLU*	-----	-----	-----	-----

* only analysed in the co-administration assay

Table 3. Mean percentage (%) and standard deviation (SD) of QUER metabolites found in plasma and the bile in the QUER alone and co-administered assay.

Metabolites	PLASMA		BILE POOL	
	Quercetin mean (%)	Quercetin + Naringenin SD	Quercetin %	Quercetin + Naringenin %
QUER-GLU	-----	-----	26.77	8.02
QUER-SULF	-----	-----	-----	-----
Isohammetin	-----	-----	89.38	45.17
ISOHR-GLU	-----	-----	16.40	5.12
ISOHR-SULF	-----	-----	20.82	7.16

References

- Xu, H. et al. Mol. Pharm. 6, 1703-1715 (2009).
- Boonpawa, R. et al. Biochem. Pharmacol. 89, 287-299 (2014).
- Varma, M.V.S., Panchagnula, R., 2005. J. Pharm. Sci. 94, 1694-1704 (2005).

Acknowledgments

This work was supported in part by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-49083-C3-1-R), the Instituto de Salud Carlos III, ISCIII (CIBEROBN) and by the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 773).

Comunicación 10: Poster

Título: Absorption of chlorogenic acid in the stomach of mice

Autores: N. Orrego-Lagarón, E. Escribano-Ferrer, M. Martínez-Huélamo, A. Vallverdú-Queralt, RM Lamuela Raventos^{2,3}

Congreso: 7th International Conference on Polyphenols and Health. Tours, Francia, 2015.

7th International Conference on Polyphenols and Health Absorption of chlorogenic acid in the stomach of mice  UNIVERSITAT DE BARCELONA

N. Orrego-Lagarón¹, E. Escribano-Ferrer^{1,3}, M. Martínez-Huélamo^{2,3}, R.M. Lamuela-Raventós^{2,3}

¹Dept. of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Institut of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona. ²Dept. of Nutrition and Food Science-CERTA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona. ³CIBER 06/003 Physiopathology of obesity and nutrition (CIBEROBN).

1. Introduction

Chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid) is a phenolic compound present in almost every plant being the coffee the major source. The daily intake between coffee drinks and other dietary sources can be higher than 100 mg/d (Olthoff 2001). Chlorogenic acid presents antioxidant properties *in vitro*, and to evaluate the possible health effects is important to evaluate its absorption and disposition *in vivo*. In spite of the absorption is not the main function of the stomach, some substances like glucose, simple sugars, amino acids, fat soluble substances and ethanol are readily absorbed. Moreover, the pH of the gastric contents controls the absorption of certain ionisable substances such as aspirin and ranitidine which are readily absorbed in its unionized form.

Aim: study the absorption and metabolism of chlorogenic acid in the stomach of mice using an *in situ* gastric perfusion technique.

2. Methods

Analytical methods:

1. HPLC-ESI-MS/MS: Identification and quantification of the aglycone and its metabolites.

Compound	rt (min)	MS/MS	DP	FP	CE	LOQ (mcg/ml)
Chlorogenic acid	2.81	353>191	-50	-190	-20	0.000148
Caffeic acid	2.97	179>135	-40	-170	-20	0.00056
Quinic acid	---	191>147	-40	-180	-30	---

Table 1. Settings of turbo ion spray source. CV: Collision voltage; EP: Entrance Potential; DP: Decustering Potential; FP: Focusing Potential; CE: Collision Energy.

❖ **Liquid chromatograph:** Agilent series 1100 equipped with a quaternary pump and a thermostated autosampler.

❖ **Column:** 5 µm Luna C18 (Phenomenex, USA)

❖ **Mobile phases** - A : H₂O with 0.1% (v/v) formic acid.

- B : Acetonitrile 0.1% (v/v) formic acid.

❖ **Method:** increasing linear gradient (v/v) of B.

❖ **Flow:** 600 µL min⁻¹.

❖ **Turbo ion spray:** negative mode with the settings in Table 1.

2. LTQ-Orbitrap: Identification of chlorogenic acid metabolites.

❖ **LTQ-Orbitrap:** Velos mass spectrometer equipped with ESI Source in negative mode was used to acquire mass spectra in profile mode with a setting of 30000 resolution at m/z 400.

❖ **Liquid chromatograph:** Accela HPLC instrument.

❖ **Column:** reversed-phase column Atlantis T3 C18 from Waters (USA).

❖ **Mass range:** From m/z 100 to 1000

❖ **Data analysis:** Xcalibur software

❖ **Operation parameters:**

- ❑ Source voltage = 4kV
- ❑ Sheath gas = 20 (au)
- ❑ Auxiliary gas = 10 (au)
- ❑ Sweep gas = 2 (au)
- ❑ Capillary temperature = 275 ° C.

❖ **Mobil phases:** - A : H₂O with 0.1% formic acid

- B : Acetonitrile with 0.1% formic acid

❖ **Method:** increasing linear gradient (v/v) of B.

❖ **Flow:** 0.635 mL / min

Perfusion experiments

❖ **Animals:** 6 male CD1 mice (30-35g)

❖ **Perfusion solution:** Isotonic solution (pH 2) containing 32 ng/ml of chlorogenic acid and 0.1 mg/ml of phenol red.

❖ **Previous conditions:** mice fed for one week with a diet absent of polyphenols.

❖ **Anesthesia:** i.p. ketamine/xylacin (100 mg/kg ; 10 mg/kg, respectively).

❖ **Assay conditions:**

- ❖ The biliary duct was tied.
- ❖ The stomach was isolated and cannulated.
- ❖ Flow: 0.16 mL/min (Q_{in}).

❖ **Samples:**

- ❖ Perfusion samples; collected at 10 min intervals for 60 min.
- ❖ Blood sample; at 60 min with cardiac puncture.
- ❖ Bile sample; the gall bladder was collected at the end of the assay.

The *in situ* perfusion model surgical technique is shown in figure 1.

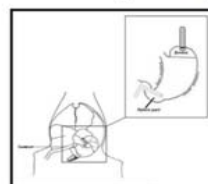


Figure 1. Gastric surgical technique.

Data analysis

❖ **Percentage of absorption** was calculated according to equation 1 (Varma and Panchagnula 2005).

$$\%_{abs} = \left[1 - e^{-\frac{2\pi R L}{\phi} P_{eff}} \right] \cdot 100$$

Equation 1 where

$$P_{eff} = \frac{-\phi_{in} \cdot L_{in} \cdot C_{in}}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L \cdot C_{out}}$$

ϕ_{in} is the flow rate, C_{in} and C_{out} are the respective inlet and corrected outlet concentrations (phenol red method) at steady state, L is the length of the stomach and R its radius calculated assuming a cylinder shape with a volume of 0.4mL and according to equation 2.

$$R = \sqrt{\frac{0.4}{\pi \cdot L}}$$

Equation 2

3. Results and conclusions

❖ Chlorogenic acid was absorbed in 55.54 ± 9.24% and neither caffeic acid nor quinic acid was not found in the perfusion samples using HPLC-MS/MS.

❖ LTQ-Orbitrap enabled us to identify low-intensity signals corresponding to chlorogenic glutation, dihydrocaffeic acid-3-O-sulfate, carboxylated quinic acid, hydroxylated quinic acid and ferulic acid (Table 2).

Compound	rt (min)	[M-H]	Acc.mass	mDa	MF
Chlorogenic glutation	15.97	966	966.2473	1	C ₁₈ H ₂₁ N ₆ O ₁₂ S ₂
Dihydrocaffeic-O-sulfate	20.22	256	256.9761	>2	C ₉ H ₈ O ₅ S
Quinic acid carboxylated	1.06	206	206.0431	1.3	C ₁₄ H ₁₄ O ₇
Quinic acid hydroxylated	20.01	207	207.051	0.3	C ₁₄ H ₁₄ O ₇
Ferulic acid	1.5	193	193.0506	0.5	C ₁₂ H ₁₂ O ₄

Table 2. List of compound identified in perfusion samples by Orbitrap

4. References

- ❖ Olthoff MR *et al.* J Nutr 131:66-71 (2001).
- ❖ Varma, M.V.S., Panchagnula, R. J. Pharm. Sci. 94, 1694-1704 (2005).

Acknowledgements

This work was supported in part by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-49083-C3-1-R), the Instituto de Salud Carlos III, ISCIII (CIBEROBN) and by the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 773).



