

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES  
FUNCIONALES DEL MANGO DURANTE EL  
ALMACENAMIENTO”**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Julio - 2015**

Autor: Lucía Sánchez Rodríguez

Tutores: Estefanía Valero Cases

Luis Noguera Artiaga



## Evaluación de las propiedades funcionales del mango durante el almacenamiento

Este Trabajo Fin de Grado ha tenido como objetivo la evaluación de las propiedades funcionales del mango (*Mangiera indica* L. cv Kent) durante 21 días de almacenamiento a 10 °C. Para ello, se determinó la actividad antioxidante por tres métodos: (i) ABTS, (ii) DPPH y (iii) FRAP; el contenido total de polifenoles y la concentración de vitamina C. Además se realizaron estas mismas determinaciones durante las diferentes etapas de digestión *in vitro* para estudiar el efecto de este proceso fisiológico sobre el metabolismo y la biodisponibilidad de dichos compuestos. Los resultados obtenidos, demuestran que el proceso de maduración del mango a 10 °C influye de manera favorable sobre la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y del ácido ascórbico. Además, se garantiza la biodisponibilidad de los mismos tras el proceso digestivo, actuando este fruto como una excelente matriz de entrega de compuestos funcionales.

**Palabras clave:** capacidad antioxidante, polifenoles, vitamina C, *Mangifera indica* L., digestión *in vitro*.

## Evaluation of functional properties of mango during storage

This work has been aimed at the evaluation of the functional properties of mango (*Mangiera indica* L. cv Kent) for 21 days of storage at 10 ° C. For this, the antioxidant activity was determined by three methods: (i) ABTS, (ii) DPPH and (iii) FRAP; total polyphenol content and the concentration of vitamin C. Also the same tests were performed at various stages of *in vitro* digestion to study the effect of this physiological process metabolism and bioavailability of said compounds. The obtained results showed that mango maturation at 10 ° C favorably affects on the antioxidant activity of the phenolic compounds and ascorbic acid. Furthermore, the bioavailability of them is secure after the digestive process, therefore this fruit as an excellent functional compounds matrix.

**Keywords:** antioxidants, polyphenols, vitamin C, *Mangifera indica* L., *in vitro* digestion.



Gracias a Estefanía y Luis por el tiempo y la ayuda dedicados, por su interés en transmitirme todo lo que saben y por enseñarme a querer mi profesión.

*A mi familia y amigos, que me han apoyado durante estos meses y me han esperado incluso cuando salía de noche del laboratorio.*

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>7</b>
1.1 Cultivo del mango.....	8
1.1.1 Origen.....	8
1.1.2 Descripción botánica y taxonómica.....	9
1.1.3 Producción mundial, exportación e importación.....	13
1.2 Valor nutricional.....	15
1.3 Propiedades antioxidantes del mango.....	17
1.3.1 Sistemas de defensa antioxidante.....	18
1.3.2 Vitamina C.....	18
1.3.3 Polifenoles.....	19
1.4 Pruebas in vitro de la capacidad antioxidante.....	21
1.4.1 Método ABTS.....	21
1.4.2 Método DPPH.....	22
1.4.3 Método FRAP.....	23
1.4.4 Método de Folin-Ciocalteu.....	23
1.4.5 Cromatografía de líquidos de alta eficacia.....	23
1.5 Absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos.....	24
1.5.1 Digestión <i>in vitro</i> .....	25
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>26</b>
<b>3 Materiales y métodos</b> .....	<b>28</b>
3.1 Material vegetal.....	29
3.2 Extracción.....	29
3.2.1 Extracción de polifenoles.....	30
3.2.2 Extracción de ácidos orgánicos.....	30
3.3 Determinaciones de capacidad antioxidante.....	31
3.3.1 Método DPPH.....	31

3.3.2 Método ABTS.....	32
3.3.3 Método FRAP .....	34
3.4 Determinación de fenoles totales.....	35
3.5 Determinación de vitamina C .....	38
3.6 Digestión <i>in vitro</i> .....	39
3.7 Análisis estadístico .....	40
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>41</b>
4.1 Evolución en el almacenamiento.....	42
4.1.1 Grupo 1 .....	42
4.1.2 Grupo 2.....	43
4.1.3 Grupo 3.....	44
4.1.4 Grupo 4.....	45
4.1.5 Grupo 5.....	46
4.2 Digestión <i>in vitro</i> .....	48
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>54</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 CULTIVO DEL MANGO

### 1.1.1 ORIGEN

El mango (*Mangifera indica* L.), pertenece a la familia de las *Anacardiaceae* en el orden de *Sapindales*. Es un fruto originario del Asia tropical, que desde sus orígenes ha pasado a ser cultivado en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (MAGRAMA, 2015). Se caracteriza por ser una fruta dulce, jugosa, con aromas frescos a pino y cítricos y una textura fibrosa y un poco astringente (**Figura 1**).



Figura 1. *Mangifera indica* L. cv Kent

Las primeras noticias sobre el mango para el mundo occidental llegan con la narración de la expedición de Alejandro Magno (327 a. C.) en la que se relata que observa un huerto de mangos en el valle del Indo. En la literatura china del siglo VII, se le ha descrito como un cultivo frutal bien conocido en las partes más cálidas de China e Indochina. Si bien los árabes y fenicios parecen haber sido responsables de la llegada de este fruto al este de África e incluso a Madagascar hacia el S. X, la dispersión del mango hacia otras zonas tropicales es muy lenta y llega de la mano de los marineros españoles y portugueses siguiendo dos rutas distintas. Aunque en Asia el cultivo comercial del mango alcanzó ya un gran florecimiento en el S. XVI, no fue hasta el XX cuando se comenzó su desarrollo en el Hemisferio Occidental. Así en tiempo de los emperadores mongoles en la India, concretamente en tiempos de Akbar el Grande (1556 – 1605), se plantó un huerto con 100.000 árboles cerca de Darbhanga en Bihar, donde se establecieron las mejores selecciones de mangos de la época. El trabajo enciclopédico “Ain-i-Akbari”, escrito durante el reinado del emperador nombrado, contiene una amplia descripción de este fruto, dando información de sus variedades, características del fruto así como las prácticas recomendadas de su cultivo (Galán, 2009).

Los españoles introdujeron los mangos desde Filipinas, a través del océano Pacífico a los puertos comerciales del continente americano entre los siglos XVI y XVII. El nombre “Manila” del cultivar tradicional mexicano es una clara indicación de este origen. Los portugueses, durante el mismo periodo, utilizaron la vía africana llevando el mango al sur de África y de ahí a Brasil. Pese a que su introducción en el continente americano fue tardía, hoy en día es uno de los frutos más apreciados en los países latinoamericanos, convirtiéndose en una parte muy importante de su cultura (Galán, 2009).

*“Almorzaba casi siempre en su casa, hacía una siesta de diez minutos sentado en la terraza del patio, oyendo en sueños las canciones de las sirvientas bajo la fronda de los mangos, oyendo los pregones de la calle, el fragor de aceites y motores de la bahía, cuyos efluvios aleteaban por el ámbito de la casa en las tardes de calor como un ángel condenado a la podredumbre.”*

*(García Márquez, G., 1985).*

### 1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA

El mango crece en un árbol (**Figura 2**) que recibe el mismo nombre que el fruto y tiene la siguiente descripción taxonómica (Trópicos, 2015; The plant list, 2015):

- Clase: *Equisetopsida* C. Agardh
- Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.
- Superorden: *Rosanae* Takht.
- Orden: *Sapindales* Juss. Ex Bercht. & L. Presl.
- Familia: *Anacardiaceae* R. Br.
- Género: *Mangifera*.
- Especie: *M. indica* L.
- Sinónimos: *Mangifera austroyunnanensis* Hu.



Figura 2. Mango

Las características morfológicas que presenta son las siguientes:

- Tronco: corteza gruesa, rugosa y escamosa.
- Copa: redonda, ancha, densa y simétrica.
- Hojas: simples, perennes, enteras, con una disposición alterna, con forma lanceolada a oblongada y de color verde oscuro.
- Inflorescencias: panículas densas de hasta 2000 flores, ampliamente ramificadas (**Figura 3**).



Figura 3. Inflorescencia mango

- Flores: pequeñas (5-10 mm) pentámeras. Masculinas y hermafroditas. Sépalos pequeños y pétalos de color variable de tonos verdes, rojos o amarillos. Un estambre con filamento blanco y antera rosada.
- Fruto: el fruto del mango es de forma variable, puede pesar hasta 2 kg, tiene la piel lisa de color variable y según la posición en el árbol tendrá la chapa más o menos grande. Tiene una semilla grande, aplastada y dura (MAGRAMA, 2015).

Al crecer en clima tropical y subtropical, requiere un clima soleado y unas temperaturas entre 15 °C y 36 °C, siendo 25 °C la temperatura óptima de crecimiento y 30 °C la óptima de maduración. La precipitación media óptima va de 400 a 3600 mm/año y se adapta a todo tipo de suelos prefiriendo los profundos, bien estructurados, con buen drenaje y pH entre 5,5 y 7,5 (MAGRAMA, 2015).

Se trata de un fruto climatérico, es decir, una vez recolectado aumenta su tasa de respiración y la producción de etileno, lo que ocasiona que siga madurando (**Figura 4**) y que sufra algunos de los siguientes cambios bioquímicos (U.C. Davis, 2015):

- Cambios de color en la piel de verde oscuro a verde claro y amarillo o rojizo y de la pulpa de amarillo verdoso al amarillo o al anaranjado como consecuencia de la degradación de clorofilas y síntesis de pigmentos como carotenoides y/o antocianos.
- Aumento de azúcares y descenso de almidón.
- Disminución de ácidos orgánicos.
- Aumento de los compuestos volátiles que contribuyen en su aroma.

- Degradación de los componentes de la pared celular, lo que provoca la pérdida de turgencia del fruto.

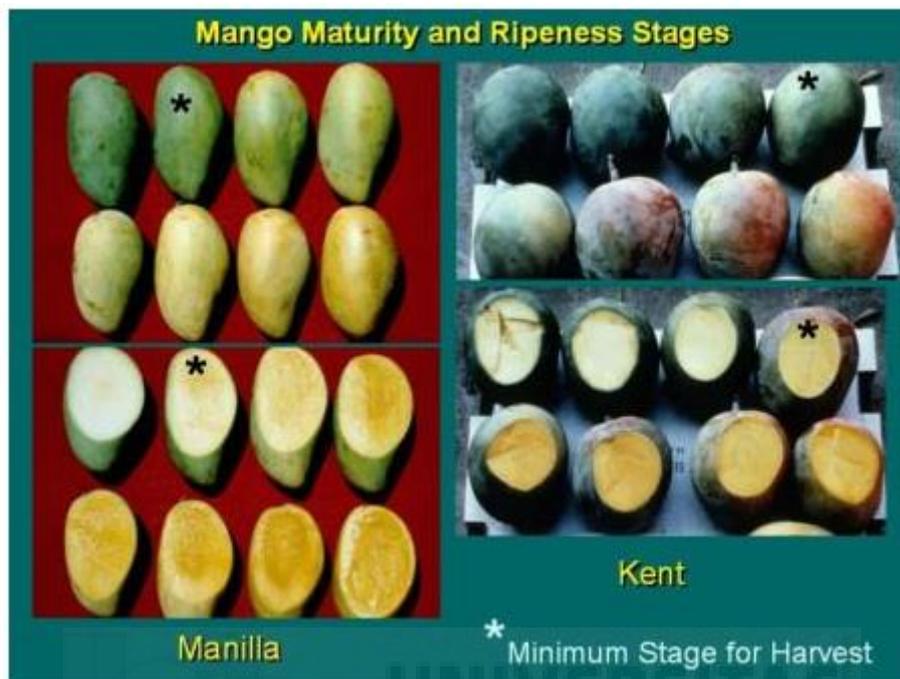
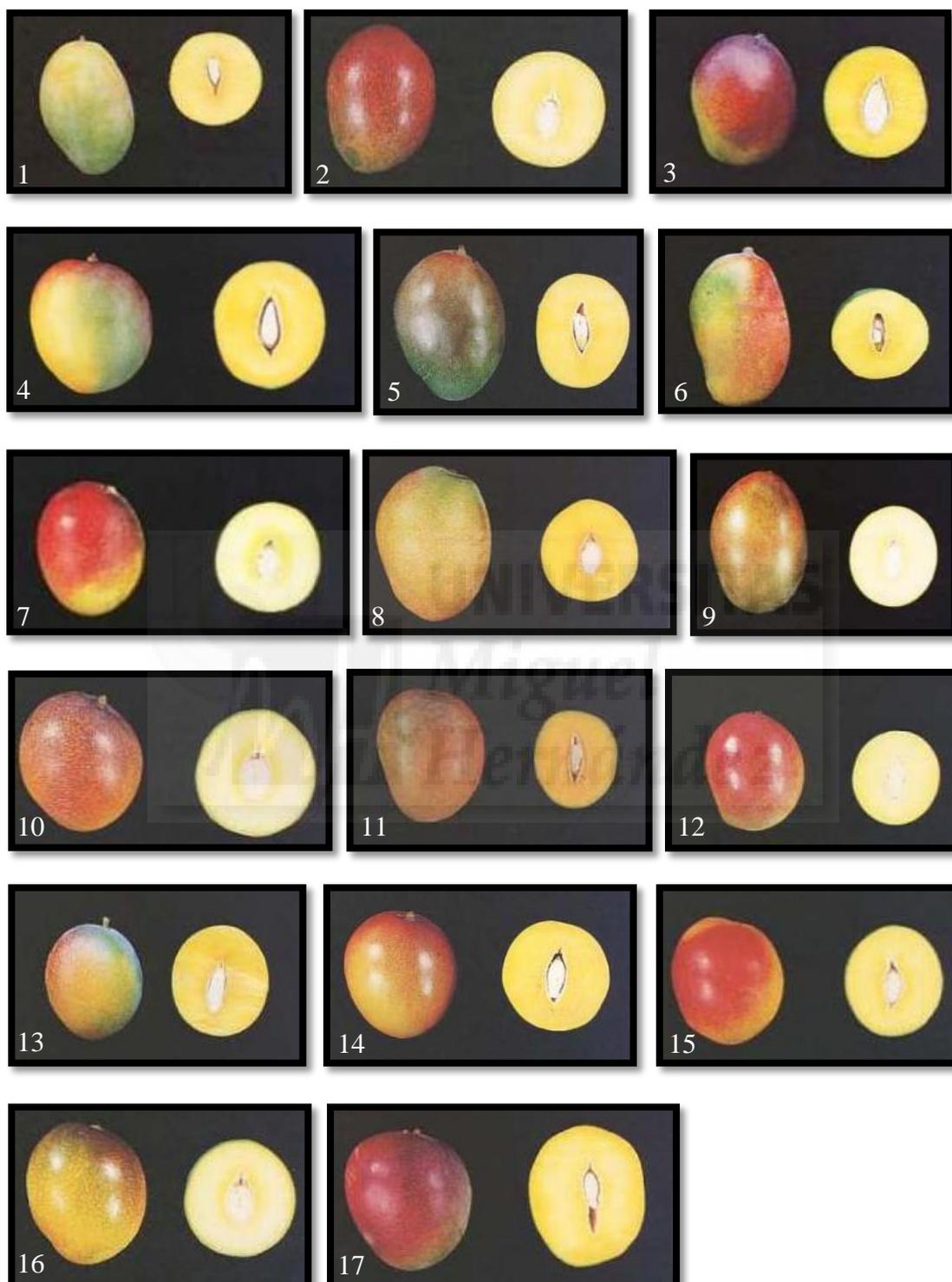


Figura 4. Evolución en la madurez del mango (U.C. Davis, 2015).

En cuanto a las variedades de mango, se puede hacer una clasificación según su lugar de origen:

- Cultivares indios: se caracterizan por ser dulces, con bajo contenido en ácidos y una longitud de fibra y color de piel muy variables, siendo algunos bastante rojos.
- Cultivares indochinos y filipinos: se diferencian de los anteriores en que la epidermis es verde amarillenta y son muy dulces y sin fibra. Se suelen exportar a Japón desde Filipinas y México.
- Cultivares americanos: se trata de variedades que se obtuvieron en Florida a partir de la variedad india Mulgoba. Son las que dominan en casi todo el mundo (**Figura 5**).



**Figura 5.** Cultivares americanos: 1. Edward. 2. Irwin. 3. Sensation. 4. Fascell. 5. Keitt. 6. Valencia Pride. 7. Otts. 8. Glenn. 9. Osteen. 10. Kent. 11. Gouveia. 12. Van Dyke. 13. Lippens. 14. Tommy Atkins. 15. Zill. 16. Haden. 17. Manzanilla Núñez (MAGRAMA, 2015).

### 1.1.3 PRODUCCIÓN MUNDIAL, EXPORTACIÓN E IMPORTACIÓN

La producción y el consumo de mango son cada vez más grandes y se extienden a muchas regiones geográficas, así como a una gran variedad de productos realizados con esta fruta, como salsas, pasta, zumo (**Figura 6**), néctar, conservas, mermeladas (**Figura 7**), puré, helado, etc. (Tharanathan *et al*, 2007).



Figura 7. Zumo de mango



Figura 6. Mermelada de mango

En los últimos años su producción ha experimentado un aumento del 43 % (**Figura 8**) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT 2013) debido a sus atractivas propiedades sensoriales, así como por el reconocimiento de sus propiedades nutricionales y sus beneficios para la salud (Dorta *et al*, 2014).

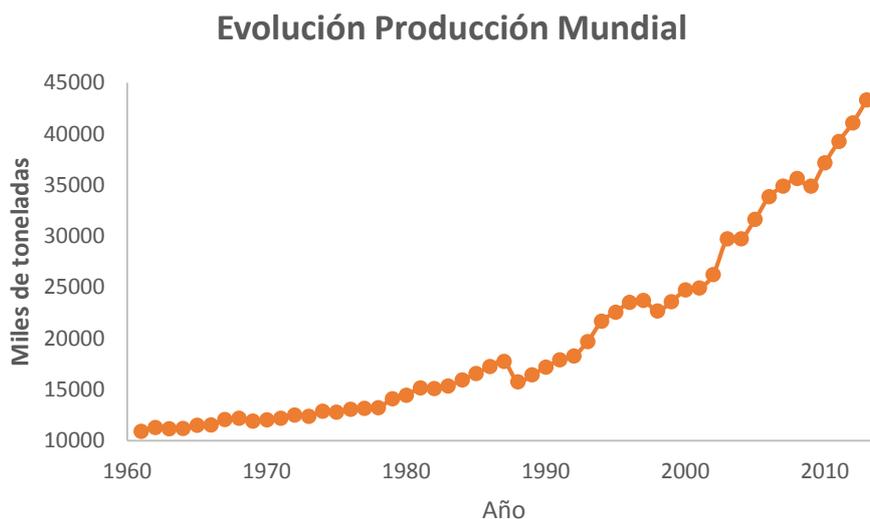


Figura 8. Miles de toneladas de mango producidas por año a nivel mundial (FAOSTAT, 2013).

El mango cuenta con una producción global que excede los 43 millones de toneladas, siendo la sexta fruta que más se produce a nivel mundial (únicamente precedido por sandía, banana, manzana, uva y naranja). Los principales países productores son India y China en el continente asiático, México y Brasil en América, Nigeria y Egipto en África y Australia en Oceanía (**Figura 9**) (FAOSTAT, 2013). Cuenta con 5,1 millones de hectáreas cultivadas en todo el mundo (FAOSTAT, 2012) y se encuentra disponible para su consumo en todas las zonas del mundo (América del Norte, Japón y Europa) ya que una gran cantidad de su producción se destina a la exportación (**Figura 10**) (FAOSTAT, 2011).

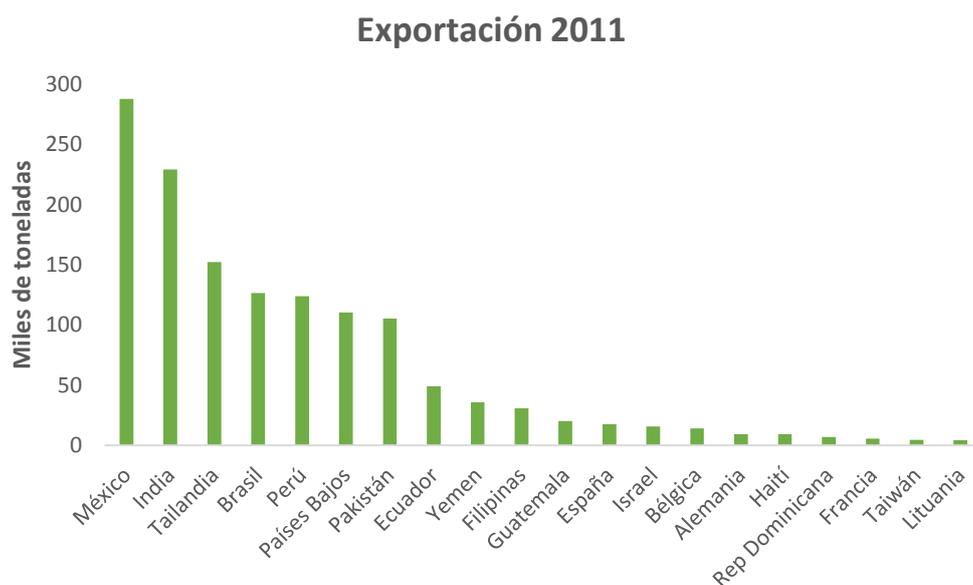
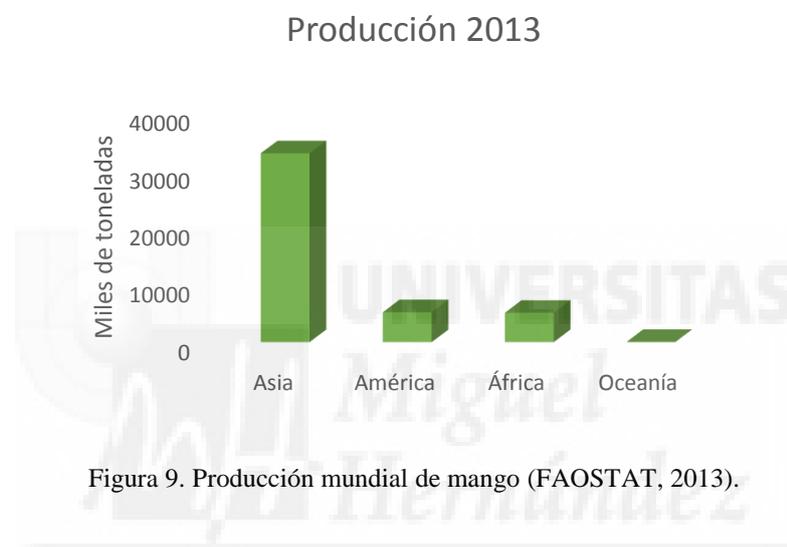


Figura 10. Miles de toneladas de mango exportadas por país en el año 2011 (FAOSTAT, 2011).

En lo que a España respecta, el mango sólo se cultiva en Canarias y Andalucía debido a las condiciones climáticas que presentan estas zonas geográficas. Con respecto a las demás frutas tropicales cultivadas en el país, el mango ocupa el cuarto lugar, contando con un 13 % de la producción global (**Figura 11**) (MAGRAMA, 2012).

### Producción de fruta tropical en España

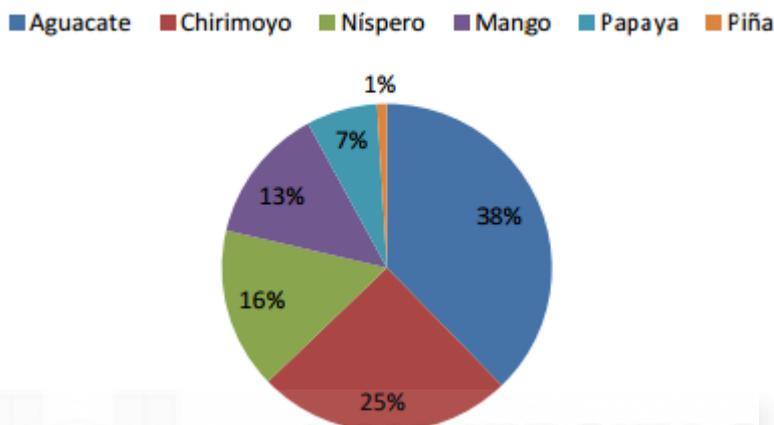


Figura 11. Porcentajes de producción de los diferentes tipos de frutas tropicales cultivadas en España (MAGRAMA 2012).

## 1.2 VALOR NUTRICIONAL

El mango presenta un elevado contenido en agua (83 %), un aporte calórico moderado, 59 kcal/100 g, las cuales provienen mayoritariamente del contenido en carbohidratos y un considerable aporte de fibra (2,3 g / 100 g). Aporta un elevado contenido en vitaminas C, E y A, de importante acción antioxidante. Respecto a las vitaminas del grupo B, se puede destacar su elevado aporte de ácido fólico, de especial importancia en la infancia y mujeres embarazadas (R (UE) n° 1135/2014). En cuanto al contenido mineral, el mango destaca por su elevado contenido en potasio, seguido de un destacado aporte de fósforo y calcio (**Tabla 1**) (Base de Datos BEDCA).

Tabla 1. Composición nutricional de 100 g de pulpa de mango. Valores expresados en gramos para los componentes mayoritarios y en miligramos o microgramos para los minoritarios (BEDCA, 2015).

<b>Información nutricional Mango (100g)</b>		
<b>Componente</b>	<b>Valor Pulpa</b>	<b>Unidad</b>
<b>Energía total</b>	245 / 59	KJ/Kcal
<b>Grasa total</b>	0,2	g
<b>AGS</b>	0,05	g
<b>AGMI</b>	0,07	g
<b>AGPI</b>	0,03	g
<b>Carbohidratos</b>	13,4	g
<b>Fibra dietética total</b>	2,3	g
<b>Proteína total</b>	0,6	g
<b>Agua</b>	83	g
<b>Vitaminas</b>		
<b>Vitamina A</b>	25	µg
<b>Vitamina D</b>	0	µg
<b>Vitamina E</b>	1,8	mg
<b>Folato total</b>	31	µg
<b>Niacina total</b>	0,4	mg
<b>Riboflavina</b>	0,05	mg
<b>Tiamina</b>	0,03	mg
<b>Vitamina B-6</b>	0,08	mg
<b>Vitamina C</b>	44	mg
<b>Minerales</b>		
<b>Calcio</b>	20	mg
<b>Hierro</b>	1,2	mg
<b>Potasio</b>	150	mg
<b>Magnesio</b>	9	mg
<b>Sodio</b>	2	mg
<b>Fósforo</b>	22	mg
<b>Selenio</b>	0,6	µg
<b>Zinc</b>	0,1	mg

### **1.3 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL MANGO**

La ingesta diaria de fruta y vegetales está asociada con un menor riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y otras enfermedades degenerativas, así como con el mantenimiento normal de las funciones corporales (Boeing *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, el mango contiene antioxidantes naturales como los polifenoles, vitamina C, carotenos y antocianos, lo que ha incrementado el interés en investigación en esta fruta así como su consumo.

Dichos antioxidantes resultan interesantes para nuestra salud ya que interactúan con los radicales libres de oxígeno disminuyendo así sus efectos nocivos en nuestro organismo.

Los radicales libres de oxígeno se producen en el organismo porque forman parte de muchas reacciones metabólicas, pero cuando se producen en exceso o los sistemas de defensa antioxidante fallan, los radicales libres reaccionan con los compuestos celulares produciendo la aparición de enfermedades e incluso la muerte (Figura 12).

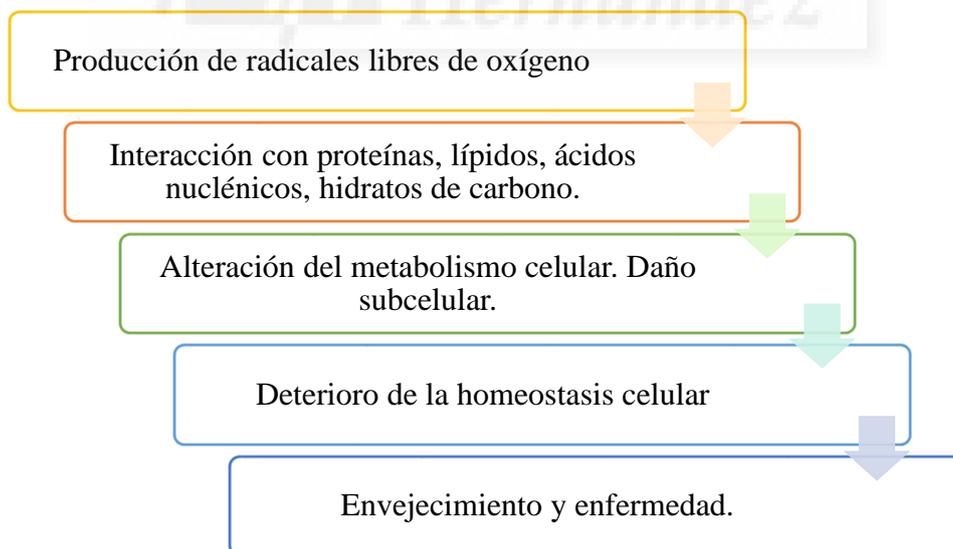


Figura 12. Acción de los radicales libres sobre las células (Gil, 2010).

Arteriosclerosis, alcoholismo, anemia falciforme, artritis reumatoide, cáncer, cirrosis, colitis ulcerativa, deficiencias nutricionales, demencia senil, dermatitis por contacto, enfermedad de Párkinson, esclerosis múltiple, gastritis crónica autoinmune, gota, etc., son algunas de las enfermedades que pueden estar relacionadas con la presencia de radicales libres de oxígeno (Gil, 2010).

### 1.3.1 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

En los alimentos se pueden distinguir dos tipos de sustancias antioxidantes (Gil, 2010):

- Sistema de defensa primario o preventivo: interactúan con los radicales libres generados directamente del oxígeno y disminuyen la velocidad de inicio de las reacciones de radicales libres. En este tipo se distinguen enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa dependiente de selenio, glutatión reductasa, etc. y los secuestradores no enzimáticos, como proteínas, glutatión, vitamina C, ácido úrico y taurina.
- Sistema de defensa secundario o rompedor de cadena: atrapan a los radicales propagadores deteniendo su efecto nocivo. En el sistema de defensa secundario, se distinguen las enzimas oxidorreductasas específicas de proteínas, proteasas, glutatión peroxidasa no dependiente de selenio, fosfolipasas, sistemas de reparación del DNA, etc. y no enzimáticos, como la vitamina E, carotenoides, ubiquinol y bilirrubina.

### 1.3.2 VITAMINA C

La vitamina C (ácido ascórbico) es una vitamina hidrosoluble capaz de reaccionar con radicales libres, principalmente los radicales peroxilo, y a este hecho se debe su capacidad antioxidante. La vitamina C neutraliza estos radicales, transformándose en el radical dehidroascorbato. De igual modo, también es capaz de reducir la formación de OH-deoxiguanosina, producida como consecuencia de la oxidación del ADN, así como de prevenir la peroxidación lipídica (Aruoma, 1999; Yen *et al*, 2002).

### 1.3.3 POLIFENOLES

Los polifenoles son sintetizados por las plantas como producto de su metabolismo secundario, siendo los compuestos no energéticos más abundantes que contienen. Su estructura se caracteriza por poseer uno o más anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados, que les otorgan su capacidad antioxidante. El diferente número de anillos sirve para clasificar los tipos de polifenoles: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzóico o del hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavanoides (Quiñones *et al*, 2012).

Una gran variedad de estos compuestos han sido encontrados en el mango (Figura 13) (Barreto *et al*, 2008).

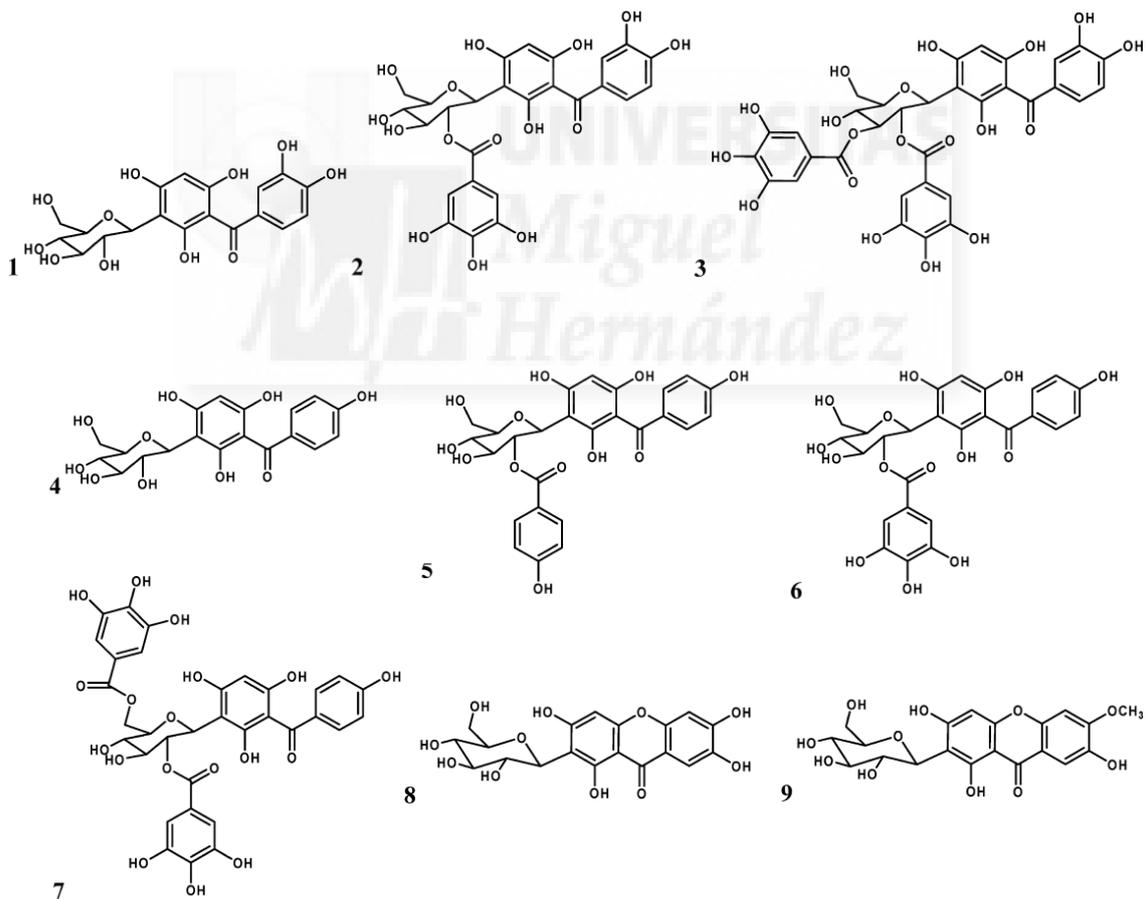


Figura 13

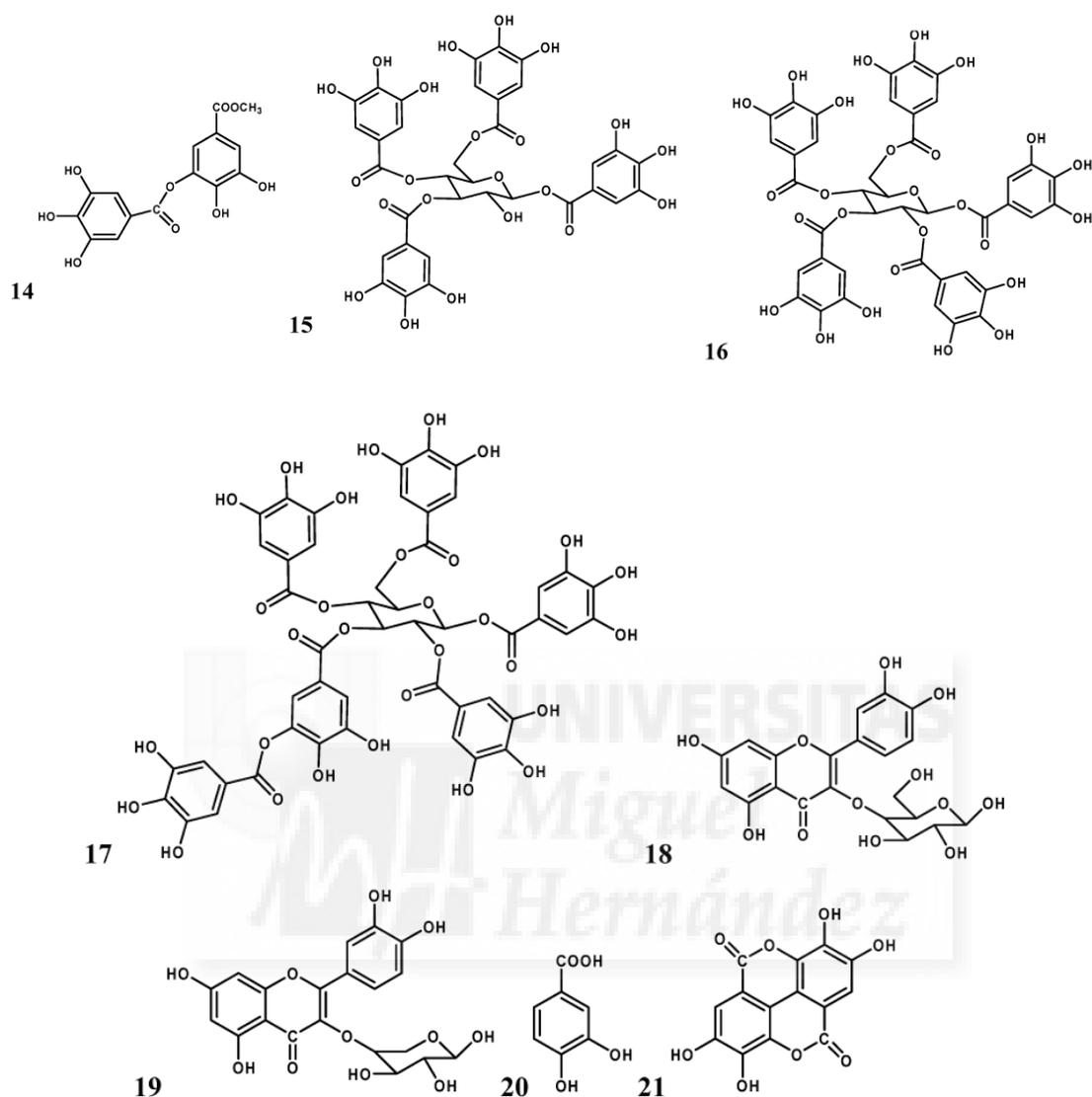


Figura 13. Polifenoles en mango: **1**, maclurin 3-C- $\beta$ -D-glucoside; **2**, maclurin 3-C-(2-O-galloyl)-  $\beta$  -D-glucoside; **3**, maclurin 3-C-(2,3-di-O-galloyl)-  $\beta$  -D-glucoside; **4**, iriflophenone 3-C-  $\beta$  -D-glucoside; **5**, iriflophenone 3-C-(2-O-p-hydroxybenzoyl)-  $\beta$  -D-glucoside; **6**, iriflophenone 3-C-(2-O-galloyl)-  $\beta$  -D-glucoside; **7**, iriflophenone 3-C-(2,6-di-O-galloyl)-  $\beta$  -D-glucoside; **8**, mangiferin; **9**, homomangiferin; **10**, 6-O-galloyl mangiferin; **11**, 6-O-(p-hydroxybenzoyl)mangiferin; **12**, gallic acid; **13**, methyl gallate; **14**, gallic acid/methyl gallate ester; **15**, tetra-O-galloyl-glucoside; **16**, penta-O galloyl-glucoside; **17**, hexa-O-galloyl-glucoside; **18**, isoquercitrin; **19**, quercetin pentoside; **20**, 3,4-dihydroxy benzoic acid; and **21**, ellagic acid (Barreto *et al.*, 2008).

## 1.4 PRUEBAS IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Como se reconoce por varios autores (Frankel y Meyer, 2000; Heo *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005; Robles-Sánchez *et al.*, 2009; Tabart *et al.*, 2009) no es válido el uso de un solo método para determinar la capacidad antioxidante en alimentos, ya que varios métodos pueden dar resultados diferentes.

Son métodos basados en la generación de radicales libres que reaccionan con la muestra de modo que los antioxidantes presentes en esta generan una respuesta inhibiendo dichos radicales. Estos métodos determinan el efecto antioxidante global de la muestra, no de cada componente por separado, por lo que resulta interesante realizar las determinaciones con varios métodos diferentes y así comparar el efecto antioxidante sobre diferentes tipos de radicales.

Se diferencian dos tipos de ensayos para dicha determinación (Sánchez-Moreno, 2002):

- Determinación directa: se forma el radical y cuando se pone en contacto con la muestra disminuye la señal debido a la disminución de la concentración del radical (ABTS<sup>+</sup> y DPPH).
- Determinación indirecta: la presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal (FRAP).

A continuación se describen brevemente algunos de los métodos más comunes para la medida de la capacidad antioxidante total de los alimentos.

### 1.4.1 MÉTODO ABTS

El radical ABTS<sup>+</sup>, procedente de su precursor ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), es de un color verde-azulado, con espectro de absorción visible, que se mide en el espectrofotómetro a 734 nm de longitud de onda (Re *et al.*, 1999).

La generación del radical se puede llevar a cabo enzimáticamente (mioglobina o peroxidasa de rábano), químicamente (radical peroxilo, persulfato potásico o dióxido de manganeso) y electroquímicamente (**Figura 14**).

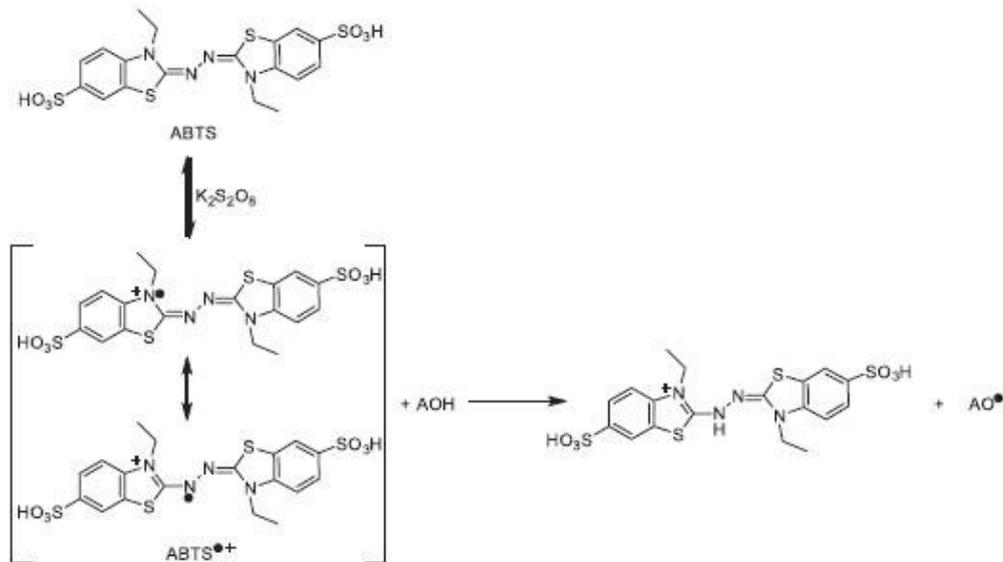


Figura 14. Oxidación del ABTS con persulfato de potasio para formar el catión  $ABTS^+$  y su reacción con compuesto antirradical (AOH)

#### 1.4.2 MÉTODO DPPH

El radical DPPH (radical 2,2difenil-1-picrilhidrazil) es de un color violáceo, con espectro de absorción a 515 nm y reacciona con el antioxidante disminuyendo su valor de absorbancia para así poder determinar el grado en que es capturado (Figura 15). Se trata de una determinación directa (Brand-Williams *et al*, 1995).

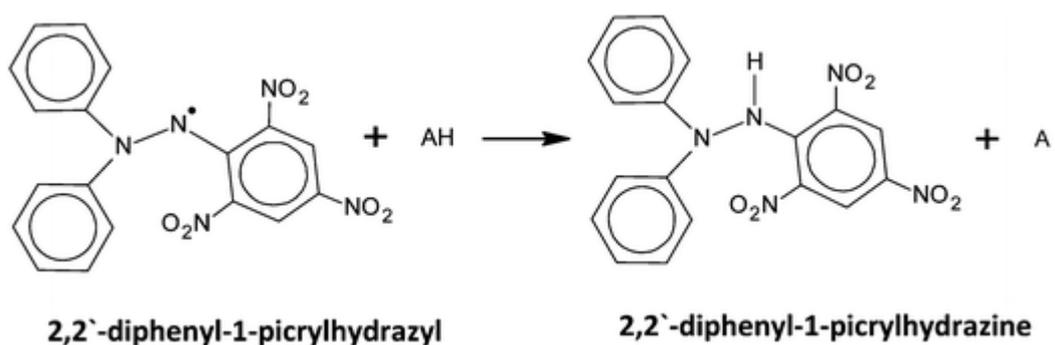


Figura 15. Reacción de DPPH con un compuesto antirradical (Pyrzynska *et al*, 2013).

### 1.4.3 MÉTODO FRAP

El método FRAP consiste en una reacción de reducción del complejo de la tipiridiltriazina férrica (TPTZ) al complejo ferroso con un antioxidante y en un medio ácido. Se trata de una determinación indirecta ya que aumenta la absorbancia conforme se reduce el complejo de TPTZ. Es una reacción que se mide a una longitud de onda de 593 nm (**Figura 16**) (Benzie & Strain, 1996).

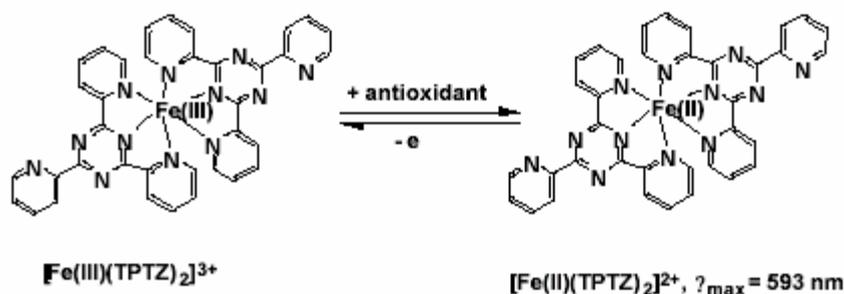


Figura 16. Reacción de lcomplejo ferroso de la tipiridiltriazina férrica con un antioxidante.

### 1.4.4 MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

La medida del contenido de fenoles totales se realiza utilizando el método de Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Consiste en medir el cambio de color de amarillo a azul que acompaña la reacción de los compuestos fenólicos con la mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. Este cambio de color se mide espectrofotométricamente a 760 nm de longitud de onda, de manera que la coloración azul aumenta con el aumento de la concentración de los fenoles.

### 1.4.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica analítica de separación más utilizada, debido a su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su sensibilidad, su idoneidad para la separación de especies volátiles o termolábiles y, sobre todo debido a su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria agroalimentaria y en otros campos de la ciencia, como por ejemplo aminoácidos, proteínas, polifenoles, ácidos orgánicos, azúcares, ácidos nucleicos, etc.

La cromatografía líquida, consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria puede ser de diversos materiales, aunque la más común está formada por gel de sílice, y la fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna y según estas interacciones químicas y el tiempo de retención en la columna, se determina la separación de los contenidos de la muestra para así poder identificarlos y cuantificarlos.

## 1.5 ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Unos de los temas de mayor importancia relativos a los efectos beneficiosos de los polifenoles en el organismo, es su biodisponibilidad. La biodisponibilidad de un compuesto funcional, depende de varios factores como: su estabilidad durante el proceso de digestión, la liberación desde la matriz del alimento, pH, temperatura, presencia de enzimas, el huésped y otros factores relacionados (Tagliazucchi, 2010). Una vez liberados de la matriz alimentaria, algunos compuestos fenólicos son metabolizados en el tracto gastrointestinal, mientras que otros pueden ser directamente absorbidos por la mucosa del intestino delgado, como es el caso de las agliconas, los compuestos fenólicos libres simples, los flavonoides y los ácidos fenólicos (Hertog y Hollman, 1996; Jiménez-Ramsey *et al*, 1994).

En la absorción intestinal, las glicosidasas del alimento, la mucosa gastrointestinal o la microflora del colon convierten los polifenoles glicosilados en agliconas. Por ejemplo, los polifenoles glicosilados se hidrolizan con la  $\beta$ -glucosidasa humana del intestino, pero los polifenoles rhamnosidos necesitan ser hidrolizados por enzimas de la microflora del colon ( $\alpha$ -rhamnosidasa) (Yang, 2001).

En cuanto a la biotransformación, los polifenoles se conjugan por glucuronidación, sulfatación y metilación en el intestino delgado, el hígado y otros órganos (**Figura 17**) (Yang, 2001).

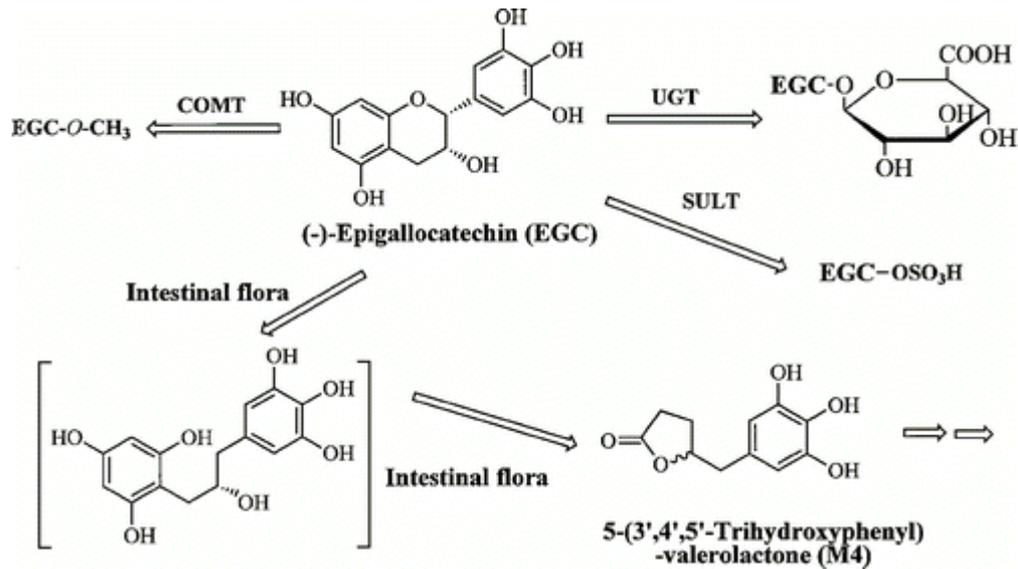


Figura 17. Biotransformación de los polifenoles utilizando la epigallocatequina como ejemplo. COMT: catecol-O-metil-trasferasa; SULT: sulfotrasferasa; UGT: UDP glucuroniltransferasa (Yang, 2001).

### 1.5.1 DIGESTIÓN IN VITRO

Los modelos de digestión *in vitro* nos permiten simular las condiciones fisiológicas que tienen lugar durante la digestión gástrica e intestinal de los alimentos. De esta forma, podemos estudiar el efecto que estas provocan sobre los compuestos antioxidantes, permitiéndonos determinar las variaciones que ocurren durante la digestión. Además nos permiten comparar los datos obtenidos con los métodos tradicionales de análisis, con el fin de obtener resultados más homogéneos (Dorrain, 2015).



El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es determinar el efecto que provoca el almacenamiento en condiciones controladas sobre las propiedades funcionales de mango, variedad Kent (*Mangifera indica* L. cv Kent).

Para la consecución de este objetivo, se han puesto a punto los métodos de determinación de la capacidad antioxidante, polifenoles totales y vitamina C siguientes:

- Determinación de la capacidad antioxidante total:
  - Método DPPH
  - Método ABTS
  - Método FRAP
  
- Determinación del contenido de polifenoles totales:
  - Método Folin-Ciocalteu
  
- Determinación del contenido en Vitamina C:
  - Cuantificación e identificación por HPLC

El segundo objetivo del trabajo es estudiar la influencia de la digestión gástrica e intestinal sobre la disponibilidad de las sustancias antioxidantes presentes en los mangos, así como estudiar el efecto que tiene el proceso de conservación sobre la composición de dichos compuestos, empleando para tal fin, técnicas de digestión *in vitro*.

3

**MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 MATERIAL VEGETAL

El estudio que queda reflejado en este Trabajo Fin de Grado, se realizó con 20 mangos (*Mangifera indica* L.) cv. Kent. Estos, se obtuvieron directamente del mercado local de Orihuela (Alicante), provenientes todos del mismo lote, garantizando de esta forma que el lugar de procedencia y tiempo de recolección eran idénticos. Para la realización de los análisis y debido a la heterogeneidad de este tipo de frutos, se distribuyeron los frutos en cinco grupos de 4 mangos cada uno, en base al color y tamaño de los mismos. Estos se almacenaron en una cámara a una temperatura controlada de 10 °C , y se tomó una muestra de cada uno de los grupos en los días 0, 7, 14 y 21 de almacenamiento. Tras la toma de muestras, se envasaron a vacío y se conservaron a una temperatura de -80 °C hasta la realización de las determinaciones (**Figura 18**).



Figura 18. Mango envasado a vacío congelado a -80 °C.

### 3.2 EXTRACCIÓN

Para la realización de las determinaciones, se descongelaron los mangos a temperatura controlada (4 °C) durante un día. (**Figura 19**). Posteriormente, se pelaron los frutos reservando la piel y se troceó la pulpa empleando una trituradora (Termomix TM31, Vorwerk, Alemania) (**Figura 20**) durante 2 minutos a 1100 rpm hasta homogeneizar el producto.



Figura 19. Mango descongelado



Figura 20. Termomix

### 3.2.1 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

En la extracción de polifenoles, se utilizó como disolvente metanol al 75 % (metanol HPLC 99,9 % J.T. Baker y agua ultrapura) acidificado con 0,1 % de ácido clorhídrico (ácido clorhídrico 37 %, Normapur).

Para la realización de la extracción de la pulpa se utilizó una relación 1:1 (peso: volumen). Se tomaron 10 g de muestra, se añadieron 10 mL de disolvente y se agitó empleando un ultra-turrax (**Figura 21**) a 13.000 rpm hasta homogeneizar el producto. A continuación se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se utilizó para las determinaciones de capacidad antioxidante filtrando 20 µL para medir con Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) (**Figura 22**) con un filtro de 0,45 µm. Los extractos se conservaron a una temperatura de -21 °C.



Figura 211. Ultra-turrax

### 3.2.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Para realizar esta extracción se utilizó como disolvente agua ultrapura acidificada con 0,1 % de ácido clorhídrico.

Para realizar la extracción de la pulpa se utilizó una relación 1:2 (peso:volumen). Se tomaron 12,5 g de muestra, se añadieron 25 mL de disolvente y se agitó en ultra-turrax a 13.000 rpm hasta homogeneizar el producto. A continuación se centrifugó a 9000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se filtraron 20 µL para HPLC (**Figura 22**) con un filtro de 0,45 µm. Los extractos se conservaron en congelador a -21 °C.



Figura 22. HPLC Hewlett Packard HP 1100.

### 3.3 DETERMINACIONES DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

#### 3.3.1 MÉTODO DPPH

El método DPPH se llevó a cabo siguiendo el método de Brand Williams, Cuvilier, y Berset (1995) con alguna modificación: se preparó el reactivo con metanol (DPPH 95 %, Alfa Aesar) y se ajustó su absorbancia a 1 con una longitud de onda de 515 nm. La recta de calibrado se realizó con Trolox (97 %, Acros Organics) 10 mM procediendo de la siguiente forma:

- a) Se prepararon 5 tubos de ensayo numerados.
- b) Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5ml, 1 mL y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5 mL con etanol.
- c) Se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad y se llenaron en el siguiente orden:
  - a. 10  $\mu$ L trolox
  - b. 40  $\mu$ L metanol
  - c. 950  $\mu$ L solución DPPH
- d) Se dejó reaccionar en oscuridad durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm.
- e) A los resultados obtenidos se les restó la absorbancia del reactivo y se realizó la representación gráfica (**Figura 23**) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.

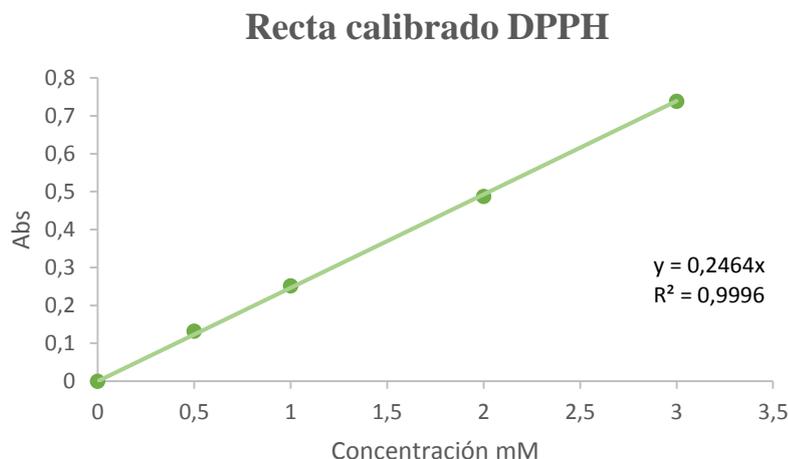


Figura 23. Recta calibrado método DPPH

Una vez realizada la recta de calibrado, se midió la capacidad antioxidante de las muestras. Este proceso se realizó por triplicado para cada extracto y se procedió de igual modo que en el llenado de las cubetas para la recta patrón. En cada cubeta se añadieron:

- a. 10  $\mu\text{L}$  muestra
- b. 40  $\mu\text{L}$  metanol
- c. 950  $\mu\text{L}$  solución DPPH.

Se dejó reaccionar durante 10 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (**Figura 24**) a 515 nm. A los resultados se les restó la absorbancia inicial del reactivo y se procedió al cálculo de la concentración de antioxidantes en función a la recta de calibrado.



Figura 2422. Espectrofotómetro

### 3.3.2 MÉTODO ABTS

El método ABTS se llevó a cabo utilizando el ensayo de decoloración del radical catión  $\text{ABTS}^+$  con alguna modificación (Re *et al.*, 1999). Se preparó el reactivo con una concentración 7 mM (ABTS 99 %, Sigma Aldrich) y tras la adición de 1 mL de persulfato de potasio 2,45 mM (Persulfato de potasio 99 %, Sigma Aldrich) se dejó reaccionar durante 12-16 horas en oscuridad para que tuviera lugar la formación del catión  $\text{ABTS}^+$ . Una vez transcurrido este tiempo, se diluyó la solución ABTS en agua ultrapura hasta ajustar su absorbancia a  $0,700 \pm 0,020$  empleando una longitud de onda de 734 nm. La recta de calibrado se realizó con trolox 10 mM procediendo de la siguiente forma:

- a) Se prepararon 5 tubos de ensayo numerados.
- b) Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5mL, 1 mL y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5 mL con etanol.
- c) Se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad y se llenaron en el siguiente orden:
  - a. 10  $\mu$ L trolox
  - b. 990  $\mu$ L solución ABTS
- d) Se dejó reaccionar en oscuridad durante 6 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm.
- e) A los resultados obtenidos se les restó la absorbancia del reactivo y se realizó la representación gráfica (**Figura 25**) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.

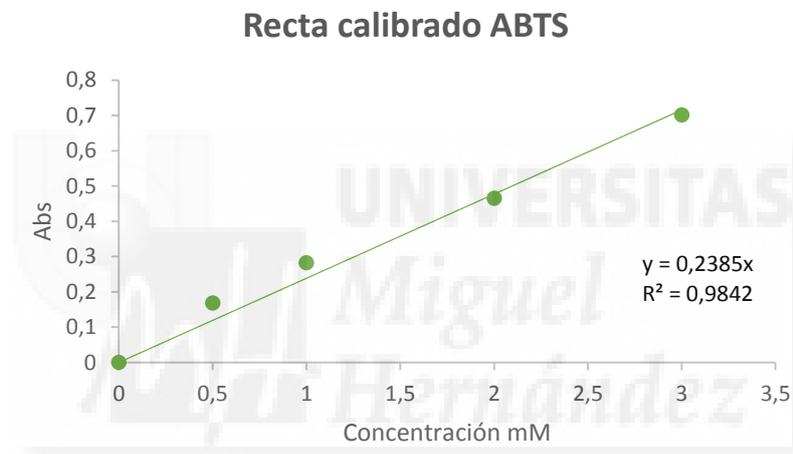


Figura 25. Recta de calibrado método ABTS

Una vez realizada la recta de calibrado, se procedió a medir la capacidad antioxidante de las muestras. Tras diversas pruebas iniciales, se optó por realizar las determinaciones empleando una dilución 1:20 de las muestras con el mismo extractante utilizado anteriormente, para así trabajar en un rango óptimo de la recta patrón. Se procedió a medir la capacidad antioxidante con las muestras diluidas por triplicado, de igual modo que en el llenado de las cubetas para la recta patrón. En cada cubeta se añadieron:

- a. 10  $\mu$ L muestra diluida.
- b. 990  $\mu$ L solución ABTS.

Se dejó reaccionar durante 6 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. A los resultados se les restó la absorbancia inicial del reactivo y se procedió al cálculo de la concentración de antioxidantes en función a la recta de calibrado.

### 3.3.3 MÉTODO FRAP

El método FRAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Benzie y Strain (1996), con alguna modificación. Se preparó el reactivo con una relación 1:1:10 de TPTZ: FeCl<sub>3</sub>: solución buffer:

- Solución buffer a pH = 3,6 con: CH<sub>3</sub>COONa (Sodio acetato 3-hidrato. 99 % Panreac) y HCl.
- HCl 40 mM.
- Reactivo TPTZ (TPTZ. 99 %, Sigma Aldrich) 40 mM con el HCl 40 mM.
- Cloruro de hierro (Iron (III) Chloride 6-hydrate, Panreac) 20 mM.

Una vez preparado el reactivo, se procedió a realizar la recta de calibrado con Trolox 10 mM:

- a) Se prepararon 5 tubos de ensayo numerados.
- b) Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de Trolox: 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5mL, 1 mL y 1,5 mL y se completó hasta un volumen de 5 mL con etanol.
- c) Se utilizaron cubetas de 1,5 mL de capacidad y se llenaron en el siguiente orden:
  - a. 10 µL trolox
  - b. 990 µL solución FRAP
- d) Se dejó reaccionar en oscuridad durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 593 nm.
- e) Se realizó la representación gráfica (**Figura 26**) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.

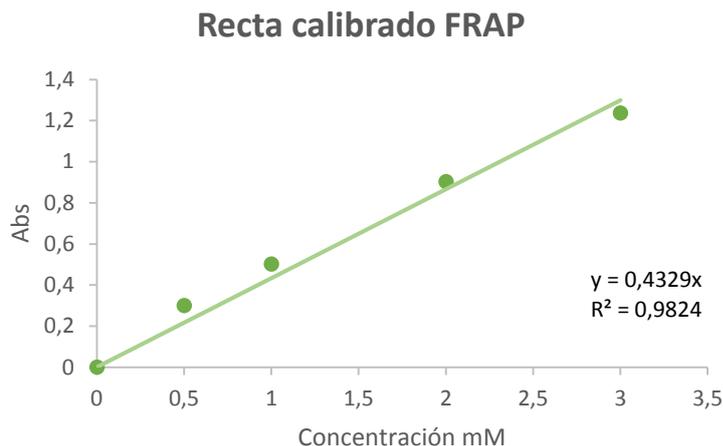


Figura 26. Recta de calibrado del método FRAP. Absorbancia frente a concentración mM de trolox

Una vez realizada la recta de calibrado, se procedió a medir la capacidad antioxidante de las muestras. Para realizar la determinación de las muestras, se realizó una dilución de las mismas al igual que en el método anterior, pero en este caso hasta una concentración final de 1:2. Seguidamente, se midió la capacidad antioxidante con las muestras diluidas por triplicado, de igual modo que en el llenado de las cubetas para la recta patrón. En cada cubeta se añadieron:

- a. 10  $\mu$ L muestra diluida.
- b. 990  $\mu$ L solución FRAP.

Se dejó reaccionar durante 10 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 593 nm. Con los resultados obtenidos se procedió al cálculo de la concentración de antioxidantes en función a la recta de calibrado.

### 3.4 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El método para la determinación de fenoles totales se llevó a cabo con el reactivo Folin, carbonato de sodio y tampón fosfato:

- Reactivo de Folin (Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu, Merck): 10 mL de reactivo de Folin más 90 mL de agua ultrapura.
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: se pesaron 1,875 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 25 mL de agua ultrapura.
- Tampón fosfato 50 mM:

- Se pesaron 0,34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Hidrogeno fosfato de potasio, Panreac) y se disolvieron en 50 mL de agua ultrapura.
- Se pesaron 0,4354 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (fosfato monoácido de potasio anhidro, Panreac) y se disolvieron en 50 mL de agua ultrapura.
- Se vertieron en un vaso los 50 mL de fosfato dipotásico y se añadió poco a poco la disolución de fosfato de potasio monobásico hasta alcanzar un pH de 7,5.

Una vez preparados los reactivos, se procedió a realizar la recta de calibrado con pirogalol 1 mM (0,0013 g en 10 mL de agua ultrapura) (Pirogalol 99 %, Sigma-Aldrich), de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Se prepararon 6 tubos de ensayo numerados.
- b) Se añadió a cada tubo 2,5 mL de reactivo de Folin.
- c) Se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de pirogalol: 0, 25, 50, 75, 100 y 125  $\mu\text{L}$  y se completó hasta un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con tampón fosfato.
- d) Se agitó y se dejó reposar durante 2 minutos.
- e) Se añadieron 2 mL de carbonato de sodio.
- f) Se colocaron los tubos en un baño previamente calentado a 50 °C durante 10 minutos.
- g) Se midió absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro.
- h) Se realizó la representación gráfica (**Figura 27**) para obtener la ecuación de la recta y poder hallar la concentración de las muestras.

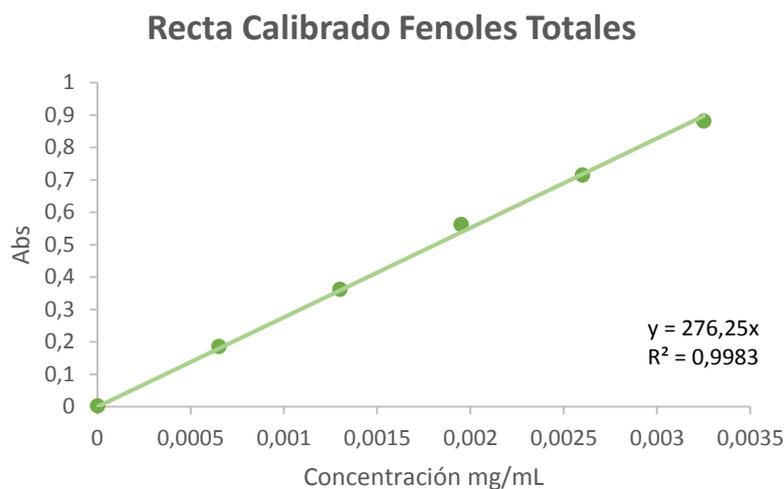


Figura 23. Recta calibrado fenoles totales. Absorbancia frente a concentración en mg / mL de pirogalol

Una vez realizada la recta de calibrado, se procedió a medir los fenoles totales de las muestras. Para este método se realizó una dilución 1:1. Se procedió a medir las muestras diluidas por triplicado, de igual modo que en el llenado de los tubos para la recta patrón.

- a) Se prepararon los tubos de ensayo numerados.
- b) Se añadió a cada tubo 2,5 mL de reactivo de Folin.
- c) Se añadió a cada tubo 100  $\mu$ L de muestra y 400  $\mu$ L de tampón fosfato.
- d) Se agitó y se dejó reposar durante 2 minutos.
- e) Se añadieron 2 mL de carbonato de sodio.
- f) Se colocaron los tubos en un baño previamente calentado a 50 °C durante 10 minutos.
- g) Se midió la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro.

Con los resultados obtenidos se procedió al cálculo de la concentración de fenoles en función a la recta de calibrado.

### 3.5 DETERMINACIÓN DE VITAMINA C

La vitamina C se determinó por cromatografía de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó un equipo de cromatografía líquida Hewlett Packard HP 1100 con una columna Supelcogel C-610H (7.8 mm x 300 mm) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y una guarda columna Supelco guard C-610H (4.6 mm x 50 mm) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Los ácidos se monitorizaron a 210 nm con un visible-ultravioleta (vis-UV) detector de diodos (DAD G1315A).

Para la fase móvil se utilizó ácido ortofosfórico (Sigma-Aldrich, Madrid) al 0,1 % y el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L con un flujo de 0,5 mL / minuto en condiciones isocráticas. Los resultados se expresaron en g/L.

Se realizó una recta de calibrado (**Figura 28**) con diferentes concentraciones conocidas de vitamina C para poder realizar los cálculos de las muestras.

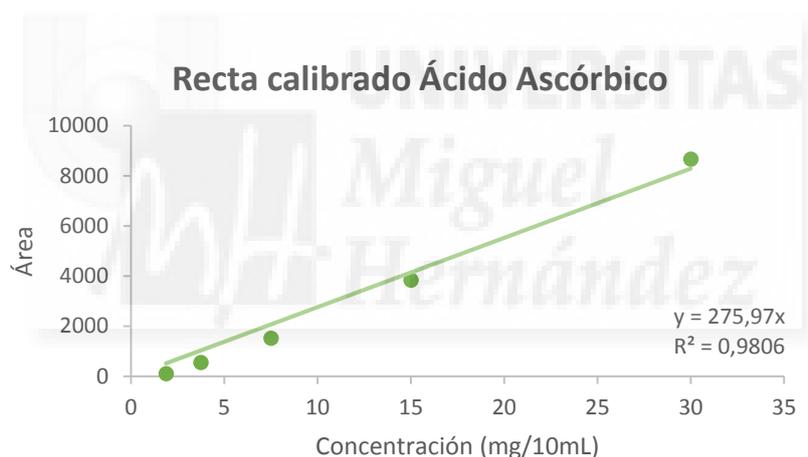


Figura28. Recta calibrado ácido ascórbico. Área del pico del cromatograma frente a concentración en mg / 10 mL.

### 3.6 DIGESTIÓN IN VITRO

La simulación gastrointestinal in vitro se realizó en un mango que no había sido almacenado (día 1) y en otro que estuvo almacenado durante todo el ensayo (día 21). El ensayo se llevó a cabo según Valero-Cases y Frutos (2015):

En primer lugar se realizó una simulación de la masticación añadiendo 1  $\mu\text{L}$  / g de  $\alpha$ -amilasa, comenzando así la digestión del mango. La simulación de los jugos gástricos (SJG) e intestinales (SJI) fue preparada con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich, Madrid). Para los SJG, el PBS se calentó previamente a 37 °C, el pH se ajustó a 3 con HCl 1 N y se adicionó 3 g/L de pepsina (Farma-química, Málaga). A 400 mL de SJG, se adicionó 100 gramos de mango (**Figura 29**) y la suspensión se mantuvo 60 min a 37 °C, bajo agitación constante a 200 rpm. Pasado este tiempo, la reacción enzimática, fue parada por neutralización con NaOH 1 N (Panreac, Barcelona) para la preparación de SJI. Posteriormente, se adicionó 1 g/L de pancreatina (Sigma, Madrid) y 4,5 g/L de sales biliares (Sigma-Aldrich Madrid) y se mantuvo 120 min a 37 °C, bajo agitación constante a 200 rpm. Para las determinaciones analíticas, se tomó muestra al finalizar el periodo de SJG y a los 60 y 120 min (**Figura 30**) de SJI.

Una vez realizada la digestión se analizó cada una de las muestras previa centrifugación a 15000 rpm y recolección del sobrenadante. Se llevaron a cabo los tres métodos de capacidad antioxidante anteriormente desarrollados en este trabajo (DPPH, ABTS y FRAP) así como los fenoles totales (Folin-Ciocalteu) y la determinación de la vitamina C. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras.



Figura30. Inicio digestión gástrica



Figura31. Fin digestión intestinal

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los análisis realizados, fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan, con el fin de comprobar si las diferencias observadas durante los análisis realizados en los muestras eran significativas. Se utilizó el software StatGraphicsPlus 5.0 Software (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, Estados Unidos). La diferencia significativa fue definida como  $p < 0,05$ .





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1 EVOLUCIÓN EN EL ALMACENAMIENTO

El contenido en capacidad antioxidante de frutas se está convirtiendo en un parámetro cada vez más importante en lo que respecta a su calidad. Sin embargo, hay poca información disponible sobre la evolución de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y ácido ascórbico durante el almacenamiento en mangos variedad Kent. Los datos experimentales que se muestran a continuación, fueron realizados para cada grupo de mangos con la finalidad de comprobar la evolución de los parámetros funcionales durante 21 días almacenamiento a 10 °C.

### 4.1.1 GRUPO 1

La **Tabla 2** muestra la capacidad antioxidante (FRAP, DPPH y ABTS), los polifenoles totales y el ácido ascórbico del grupo 1 de mangos durante 21 de almacenamiento. En los resultados obtenidos, se pudo observar que la capacidad antioxidante aumentó de manera significativa a partir de los 14 días de almacenamiento a 10 °C en todos los métodos ensayados.

Tabla 2. Capacidad antioxidante del grupo 1 expresada en mmol equivalentes de Trolox / 100 g de pulpa de mango para los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Fenoles totales del grupo 1 expresados como mg equivalentes de pirogalol / 100 g de pulpa de mango y ácido ascórbico expresado en mg / 100 g de pulpa de mango.

GRUPO 1				
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<b>DPPH</b>	103,50 ± 6,02 <sup>a</sup>	116,01 ± 15,67 <sup>a</sup>	145,11 ± 3,34 <sup>b</sup>	178,48 ± 9,97 <sup>c</sup>
<b>ABTS</b>	66,13 ± 8,53 <sup>a</sup>	78,25 ± 9,51 <sup>a</sup>	158,12 ± 23,51 <sup>b</sup>	364,31 ± 35,79 <sup>c</sup>
<b>FRAP</b>	133,38 ± 9,82 <sup>a</sup>	193,20 ± 32,21 <sup>ab</sup>	205,74 ± 22,93 <sup>bc</sup>	269,19 ± 20,19 <sup>c</sup>
<b>Polifenoles totales</b>	103,77 ± 2,48 <sup>a</sup>	147,32 ± 3,21 <sup>b</sup>	150,17 ± 2,93 <sup>b</sup>	188,38 ± 6,88 <sup>c</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	102,19 ± 3,11 <sup>a</sup>	141,40 ± 4,27 <sup>b</sup>	168,51 ± 4,58 <sup>c</sup>	229,23 ± 2,97 <sup>d</sup>

Valores expresados ± desviación estándar de tres determinaciones. Valores seguidos por la misma letra, dentro de la misma fila, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

En el método de DPPH se observó un aumento del 42 % de la capacidad antioxidante, haciéndose significativo a partir del día 14. Para el método de ABTS se observó la misma evolución que en el anterior, siendo en este caso el aumento de un 81,8 %. En el caso del método FRAP la evolución fue de una forma más progresiva y se dio un aumento del 50,4 %. Este aumento de capacidad antioxidante, está relacionado con el aumento de polifenoles y ácido ascórbico de los mangos durante el periodo de almacenamiento haciéndose más notable a partir de los 14 días, donde se observó un aumento significativo de ambos compuestos funcionales.

#### 4.1.2 GRUPO 2

En el estudio de la evolución de la capacidad antioxidante para el grupo 2 (Tabla 3), podemos observar que se mantiene la misma tendencia de la capacidad antioxidante en función del tiempo de conservación, que la observada en el lote anterior.

Tabla 3. Capacidad antioxidante del grupo 2 expresada en mmol equivalentes de Trolox / 100 g de pulpa de mango para los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Fenoles totales del grupo 2 expresados como mg equivalentes de pirogalol / 100 g de pulpa de mango y ácido ascórbico expresado en mg / 100 g de pulpa de mango.

GRUPO 2				
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<b>DPPH</b>	109,39 ± 17,88 <sup>a</sup>	116,55 ± 16,65 <sup>ab</sup>	141,72 ± 6,58 <sup>bc</sup>	163,69 ± 8,87 <sup>c</sup>
<b>ABTS</b>	98,61 ± 12,28 <sup>a</sup>	164,53 ± 25,79 <sup>b</sup>	196,98 ± 22,42 <sup>b</sup>	367,22 ± 20,61 <sup>c</sup>
<b>FRAP</b>	139,92 ± 17,45 <sup>a</sup>	188,03 ± 13,88 <sup>b</sup>	219,56 ± 8,38 <sup>c</sup>	321,58 ± 19,03 <sup>d</sup>
<b>Polifenoles totales</b>	102,19 ± 3,11 <sup>a</sup>	141,40 ± 4,27 <sup>b</sup>	168,51 ± 4,58 <sup>c</sup>	229,23 ± 2,97 <sup>d</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	60,79 ± 3,04 <sup>a</sup>	61,92 ± 0,52 <sup>a</sup>	62,14 ± 0,65 <sup>a</sup>	65,78 ± 0,25 <sup>b</sup>

Valores expresados ± desviación estándar de tres determinaciones. Valores seguidos por la misma letra, dentro de la misma fila, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Todos los métodos presentaron una evolución constante en la que la capacidad antioxidante aumentó de forma progresiva, entre los días 1 y 21, en el caso del DPPH se produjo un aumento del 33,1 %, en ABTS de 73,1 % y en FRAP del 53,5 %. Paralelamente, se observó que el contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico (Tabla 3) cambió significativamente, aumentando de manera gradual durante el almacenamiento y alcanzando valores más altos a los 21 días. Los fenoles totales aumentaron de 102,19 a 229,23 mg eq pirogalol / 100 g de pulpa, lo que supone un aumento significativo del 55 %. Mientras que para el ácido ascórbico se observó un aumento de un 8%. Estos incrementos coinciden con el aumento progresivo de los diferentes métodos de capacidad antioxidante durante el periodo de almacenamiento.

#### 4.1.3 GRUPO 3

La **tabla 4** muestra la evolución de la capacidad antioxidante, polifenoles totales y ácido ascórbico para el lote 3. Durante los primeros 14 días de almacenamiento, el DPPH no mostró diferencias significativas. El cambio significativo, se observó al final del periodo de almacenamiento.. La estabilidad observada durante los primeros 14 días, podría estar relacionada con la estabilidad que muestra el ácido ascórbico para el mismo periodo de almacenamiento. Puesto que el ácido ascórbico es capaz de reaccionar con el DPPH cediendo dos hidrógenos y pasando a su forma oxidada como ácido dehidroascórbico, explicando así su eficiencia como un potente antioxidante y estableciendo una relación directamente proporcional; concentración de ascórbico vs DPPH (Villanueva-Tiburcio *et al.*, 2010).

En cambio en el método ABTS y FRAP, se observó un aumento significativo a los 14 días. Con aumentos de ca. 55 % para ambos métodos.

Tabla 4. Capacidad antioxidante del grupo 3 expresada en mmol equivalentes de Trolox / 100 g de pulpa de mango para los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Fenoles totales del grupo 3 expresados como mg equivalentes de pirogalol / 100 g de pulpa de mango y ácido ascórbico expresado en mg / 100 g de pulpa de mango.

GRUPO 3				
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<b>DPPH</b>	111,19 ± 12,82 <sup>a</sup>	119,33 ± 0,84 <sup>a</sup>	121,55 ± 7,39 <sup>a</sup>	151,97 ± 12,91 <sup>b</sup>
<b>ABTS</b>	179,14 ± 25,37 <sup>a</sup>	218,25 ± 20,41 <sup>a</sup>	356,16 ± 23,67 <sup>b</sup>	402,93 ± 43,34 <sup>b</sup>
<b>FRAP</b>	148,61 ± 23,00 <sup>a</sup>	179,77 ± 18,74 <sup>a</sup>	226,05 ± 14,01 <sup>b</sup>	323,89 ± 35,13 <sup>c</sup>
<b>Polifenoles totales</b>	151,57 ± 2,34 <sup>a</sup>	162,41 ± 2,03 <sup>a</sup>	191,91 ± 10,34 <sup>b</sup>	234,74 ± 7,89 <sup>c</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	62,88 ± 3,14 <sup>a</sup>	64,91 ± 3,51 <sup>a</sup>	66,97 ± 1,04 <sup>a</sup>	70,38 ± 1,75 <sup>b</sup>

Valores expresados ± desviación estándar de tres determinaciones. Valores seguidos por la misma letra, dentro de la misma fila, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.4 GRUPO 4

En el caso del lote 4, se observó la misma tendencia respecto a la capacidad antioxidante que en los lotes anteriores (Tabla 5). La capacidad antioxidante aumentó con el paso del tiempo de almacenamiento en los mangos estudiados. En el ensayo DPPH se dio un aumento del 34,7 % entre los días 1 y 21. Este aumento fue del 60,5 % en el método ABTS, siendo más significativo en el día 21 y del 39,8 % en el caso del FRAP, en el que también se vio el mayor aumento en el último día de ensayo. Al igual que se pudo comprobar con los anteriores lotes, durante la evolución del almacenamiento se observó un aumento del ácido ascórbico y compuestos fenólicos, marcando una diferencia más notable a partir de los 14 días para ambos compuestos funcionales (Tabla 5).

Tabla 5. Capacidad antioxidante del grupo 4 expresada en mmol equivalentes de Trolox / 100 g de pulpa de mango para los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Fenoles totales del grupo 4 expresados como mg equivalentes de pirogalol / 100 g de pulpa de mango y ácido ascórbico expresado en mg / 100 g de pulpa de mango.

GRUPO 4				
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<b>DPPH</b>	118,12 ± 5,08 <sup>a</sup>	133,84 ± 5,68 <sup>b</sup>	149,98 ± 6,11 <sup>c</sup>	181,05 ± 8,88 <sup>d</sup>
<b>ABTS</b>	179,51 ± 20,62 <sup>a</sup>	214,38 ± 57,51 <sup>ab</sup>	233,64 ± 22,35 <sup>b</sup>	454,23 ± 35,90 <sup>c</sup>
<b>FRAP</b>	208,58 ± 21,02 <sup>a</sup>	210,82 ± 20,55 <sup>a</sup>	247,94 ± 19,67 <sup>a</sup>	346,54 ± 13,54 <sup>b</sup>
<b>Polifenoles totales</b>	162,69 ± 4,85 <sup>a</sup>	164,56 ± 7,50 <sup>a</sup>	203,51 ± 8,09 <sup>b</sup>	273,33 ± 2,56 <sup>c</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	62,49 ± 3,14 <sup>a</sup>	65,35 ± 0,43 <sup>a</sup>	77,17 ± 3,86 <sup>b</sup>	100,75 ± 15,93 <sup>c</sup>

Valores expresados ± desviación estándar de tres determinaciones. Valores seguidos por la misma letra, dentro de la misma fila, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.5 GRUPO 5

En la **tabla 6**, se puede observar la evolución de la capacidad antioxidante, polifenoles totales y ácido ascórbico para el lote 5. En los ensayos ABTS y FRAP, se observó un aumento significativo de la concentración de antioxidantes a partir de los 7 días de almacenamiento, haciéndose más pronunciado este aumento en la última semana. Concretamente se dio un aumento del 54,8 % para el ABTS y del 47,9 % para el FRAP. Para el DPPH, la tendencia fue más estable, observándose un cambio significativo a partir de los 14 días y permaneciendo sin cambios hasta el final del almacenamiento. Dichos cambios en la capacidad antioxidante, están en concordancia con el aumento de polifenoles totales y ácido ascórbico, donde en ambos casos, se produce un aumento significativo a partir de los 14 días de almacenamiento, con un incremento del 55 % al final del almacenamiento para los polifenoles totales respecto al día 1. Mientras que para el ácido ascórbico se observó un aumento del 6 %, partiendo de 63,46 mg/ 100 g hasta 75 mg/100 g.

Tabla 6. Capacidad antioxidante del grupo 5 expresada en mmol equivalentes de Trolox / 100 g de pulpa de mango para los métodos DPPH, ABTS y FRAP. Fenoles totales del grupo 5 expresados como mg equivalentes de pirogalol / 100 g de pulpa de mango y ácido ascórbico expresado en mg / 100 g de pulpa de mango.

GRUPO 5				
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<b>DPPH</b>	160,79 ± 12,01 <sup>a</sup>	163,45 ± 6,77 <sup>a</sup>	164,85 ± 16,54 <sup>a</sup>	175,76 ± 4,01 <sup>a</sup>
<b>ABTS</b>	179,51 ± 13,69 <sup>a</sup>	196,98 ± 22,27 <sup>ab</sup>	218,25 ± 23,79 <sup>b</sup>	397,17 ± 40,75 <sup>c</sup>
<b>FRAP</b>	188,04 ± 13,88 <sup>a</sup>	232,74 ± 20,55 <sup>b</sup>	258,68 ± 20,30 <sup>b</sup>	361,23 ± 7,93 <sup>c</sup>
<b>Polifenoles totales</b>	140,60 ± 3,07 <sup>a</sup>	151,42 ± 4,27 <sup>a</sup>	196,75 ± 3,11 <sup>b</sup>	315,01 ± 13,11 <sup>c</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	63,46 ± 0,99 <sup>a</sup>	64,38 ± 1,98 <sup>a</sup>	70,67 ± 0,95 <sup>b</sup>	75,14 ± 0,66 <sup>c</sup>

Valores expresados ± desviación estándar de tres determinaciones. Valores seguidos por la misma letra, dentro de la misma fila, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Tal y como se ha podido observar, todos los grupos de trabajo han mantenido la misma tendencia de aumento en la capacidad antioxidante durante los 21 días de almacenamiento a 10 °C. Este aumento coincidió con el aumento de ácido ascórbico y polifenoles totales para todos los grupos.

De acuerdo a los tres métodos de capacidad antioxidantes utilizados, se observó que el método ABTS presentó un mayor aumento en los valores de capacidad antioxidante respecto a los métodos DPPH y FRAP. Este aumento podría estar relacionado con la reacción de otros compuestos funcionales (carotenos, vitamina E), no evaluados en este experimento. Estudios anteriores, mostraron un aumento de la intensidad de color naranja en el mesocarpio de los mangos, junto con una disminución de la luminosidad, que asociaron con un incremento en el contenido de carotenos de los mangos variedad Keitt y Ataulfo (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Ibarra Garza, 2015).

También se observaron aumentos de capacidad antioxidantes durante el almacenamiento refrigerado en estudios realizados para apio (Viña y Chaves, 2006), fresas, grosellas, frambuesas, guindas (Piljac-Žegarac y Šamec D, 2011). En otros estudios realizados en fresas a diferentes temperaturas de almacenamiento 0, 5 y 10 °C, obtuvieron un aumento de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en las fresas

almacenadas a 10 °C (Shin *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2011). En estudios de almacenamiento en mangos variedad Ataulfo, se observó un aumento de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento que se correlacionó positivamente con el aumento fenólico total y la tasa de respiración de los frutos (Palafox *et al.*, 2012).

El contenido fenólico que se mantuvo estable durante los primeros días de almacenamiento podría estar relacionado con la estabilidad de los compuestos fenólicos mayoritarios encontrados en el mango (galotaninos y ácido gálico) (Kim *et al.*, 2009). El aumento de los compuestos fenólicos también podría estar relacionado con el aumento que se encontró en los mangos durante el almacenamiento del ácido shikímico (datos no mostrados), ya que los compuestos fenólicos son sintetizados a través de la vía del ácido shikímico (Tomás-Barberán y Espín, 2001) y/o por los galotaninos de alto peso molecular que pueden dividirse en galotaninos más pequeños por hidrólisis enzimática durante el almacenamiento (Soong y Barlow, 2006). Por lo tanto, los mangos durante su maduración para evitar el estrés oxidativo pueden activar mecanismos de defensa antioxidante como la síntesis de compuestos fenólicos (Palafox *et al.*, 2012).

Todo esto sugiere que tanto el proceso fisiológico como la maduración de los mangos, afecta favorablemente a los compuestos fenólicos y al ácido ascórbico y, por lo tanto, a la capacidad antioxidante de estos frutos.

## 4.2 DIGESTIÓN *in vitro*

Para ejercer su bioactividad, los antioxidantes primero deben ser bioaccesibles, es decir liberados de la matriz alimentaria durante la digestión (Bouayed *et al.*, 2011). Numerosos estudios se han realizado para comprobar la bioaccesibilidad en alimentos ricos en compuestos fenólicos como en manzanas (Bouayed *et al.*, 2012), moras (Liang, *et al.*, 2012), uva (Tigliazucchi *et al.*, 2010), granada (Mosele *et al.*, 2015), pero hasta el momento no se han realizado estudios de digestión *in vitro* en mango durante el periodo de almacenamiento. Por lo tanto, con la finalidad de comprobar el metabolismo y biodisponibilidad del aumento de los compuestos funcionales observados en los mangos durante el almacenamiento, se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro* para dos de los mangos en diferentes periodos de almacenamiento.

La **tabla 7**, muestra la evolución de la capacidad antioxidante y compuestos funcionales para un mango a día 1 de almacenamiento (M1) y para un mango al final del periodo de almacenamiento (M21). Los resultados obtenidos en todos los métodos ensayados, mostraron una menor concentración respecto a la observada durante el ensayo de almacenamiento a tiempo inicial. Esta disminución puede estar influenciada por el método de extracción empleado, ya que en este estudio se utilizó PBS a tiempo inicial para la extracción de las muestras controles con el objetivo de estandarizar y poder comparar con los posteriores análisis realizados durante la digestión. Estos resultados iniciales indican que únicamente el PBS neutro sin enzimas, no es un buen agente extractante para las muestras controles.

Los resultados para los tres métodos usados para determinar la capacidad antioxidante, indicaron una diferencia significativa al finalizar la primera hora de digestión gástrica respecto a las muestras controles para ambos mangos. Pero tras finalizar la primera hora de digestión intestinal se observó un mayor aumento para el M1 en todos los métodos estudiados, en cambio para el M21, solamente se observó en el ABTS, mientras que para el FRAP y el DPPH fue menor que en la digestión gástrica. En estudios anteriores se ha sugerido que el método ABTS (llevado a cabo en un medio tamponado de 7) es más adecuado que a pH ácidos (Bouayed *et al.*, 2012).

Al transcurrir dos horas de digestión intestinal, el M1 permaneció sin diferencias significativas respecto a la primera hora de digestión intestinal. Mientras que el M21 se observó una disminución de la capacidad antioxidante para todos los métodos realizados.

Estos cambios en la capacidad antioxidante durante la digestión *in vitro*, están en concordancia con los resultados obtenidos para los polifenoles totales y el ácido ascórbico. Donde se observó un aumento de polifenoles totales a partir de la primera hora de digestión intestinal para el M21, esta liberación de polifenoles en esta fase de digestión podría justificarse con la diferencia de textura que se observó entre los mangos al inicio del ensayo. El mango M21, tras permanecer en almacenamiento durante 21 días, sufrió una disminución en las propiedades texturales, que favorecen una pronta liberación de los compuestos fenólicos durante la digestión gástrica. Pero el mayor aumento se observó al finalizar la primera hora de digestión intestinal para ambos mangos. Este aumento después de la fase intestinal, podría explicarse por el

tiempo adicional de extracción, el pH y el efecto de las enzimas intestinales, que mejoran la liberación de la matriz alimentaria (Cilla 2012). En otros estudios también se ha planteado que el aumento de compuestos fenólicos sea mayor en la fase intestinal debido a la desprotonación de los restos hidroxilos presentes en sus anillos causada por la transición de medio ácido a medio alcalino (Bouayed *et al.*, 2012). Estudios realizados en manzanas (Bouayed *et al.*, 2012), moras (Liang *et al.*, 2012), uva (Tigiazucchi *et al.*, 2010), y granada (Mosele *et al.*, 2015) mostraron una mayor liberación de compuestos fenólicos durante la fase de digestión intestinal.

Tabla 7. Capacidad antioxidante de M1 y M21 expresada en mmol equivalentes de Trolox / 100 g de pulpa de mango para los métodos DPPH, ABTS y FRAP a lo largo del proceso de digestión. Fenoles totales de M1 y M21 expresados como mg equivalentes de pirogalol / 100 g de pulpa de mango y ácido ascórbico expresado en mg / 100 g de pulpa de mango a lo largo del proceso de digestión.

Digestión <i>in vitro</i>					
		Control	Digestión gástrica (1h)	Digestión intestinal (1h)	Digestión intestinal (2h)
<b>DPPH</b>	M1	27,07 ± 1,21 <sup>a</sup>	73,60 ± 0,38 <sup>b</sup>	78,16 ± 4,34 <sup>c</sup>	75,12 ± 0,65 <sup>bc</sup>
	M21	30,84 ± 1,28 <sup>a</sup>	144,96 ± 6,75 <sup>c</sup>	126,43 ± 11,33 <sup>bc</sup>	91,64 ± 2,96 <sup>b</sup>
<b>ABTS</b>	M1	32,91 ± 2,07 <sup>a</sup>	71,45 ± 2,92 <sup>b</sup>	253,53 ± 29,75 <sup>c</sup>	323,46 ± 16,94 <sup>c</sup>
	M21	32,12 ± 2,08 <sup>a</sup>	183,52 ± 14,82 <sup>b</sup>	332,37 ± 5,66 <sup>d</sup>	273,35 ± 21,55 <sup>c</sup>
<b>FRAP</b>	M1	46,73 ± 3,24 <sup>a</sup>	70,89 ± 1,38 <sup>b</sup>	96,74 ± 10,45 <sup>c</sup>	98,32 ± 7,00 <sup>c</sup>
	M21	51,85 ± 1,45 <sup>a</sup>	201,27 ± 3,40 <sup>d</sup>	156,88 ± 3,37 <sup>c</sup>	114,45 ± 1,63 <sup>b</sup>
<b>Polif. totales</b>	M1	67,17 ± 1,69 <sup>a</sup>	113,95 ± 14,11 <sup>a</sup>	195,95 ± 9,08 <sup>b</sup>	211,77 ± 24,22 <sup>b</sup>
	M21	74,74 ± 2,43 <sup>a</sup>	225,74 ± 11,46 <sup>bc</sup>	242,976 ± 9,76 <sup>c</sup>	211,80 ± 16,00 <sup>b</sup>
<b>Vit. C</b>	M1	47,28 ± 2,36 <sup>a</sup>	54,02 ± 2,7 <sup>b</sup>	48,78 ± 2,44 <sup>a</sup>	46,32 ± 2,32 <sup>a</sup>
	M21	37,87 ± 1,89 <sup>a</sup>	55,11 ± 2,76 <sup>c</sup>	48,78 ± 2,44 <sup>b</sup>	51,11 ± 2,56 <sup>bc</sup>

Valores expresados ± desviación estándar de tres determinaciones. Valores seguidos por la misma letra, dentro de la misma fila, no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

En cambio, para el ácido ascórbico, en ambos mangos, se observó mayor disponibilidad de ácido ascórbico en la digestión gástrica, observándose una disminución tras finalizar la primera hora de digestión intestinal y permaneciendo sin cambios significativos al final de las dos horas. Esta disminución en la fracción bioaccesible puede estar influenciada por los cambios de pH y el mayor tiempo de exposición a la presencia de oxígeno durante las dos horas de digestión intestinal (Cilla *et al.*, 2011). Los mismos resultados se encontraron para estudios realizados en granada (Perez-Vicente *et al.*, 2012) y en diferentes tipos de zumos de frutas (Cilla *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos sugieren que el tracto gastrointestinal actúa como un buen extractor para la liberación de los compuestos funcionales de la matriz alimentaria (mango) poniéndose a disposición para su absorción o para ejercer sus efectos biológicos en el tracto intestinal.



## 5. CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el proceso de maduración del mango cv. Kent influye de manera favorable en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y del ácido ascórbico. Esto representa una ventaja para el consumidor, ya que garantiza un excelente aporte nutricional junto a un equilibrio visual del fruto durante todo el periodo de almacenamiento. Al mismo tiempo, estos resultados también benefician a la industria alimentaria, ya que les permite seleccionar la etapa de maduración idónea para así poder ofrecer al consumidor mangos de una calidad superior. Por otro lado, todos los resultados obtenidos durante el almacenamiento, se refuerzan al poder garantizar la biodisponibilidad de los polifenoles totales así como del ácido ascórbico, actuando de este modo el mango como una excelente matriz de entrega de compuestos funcionales. Muchas de las recomendaciones nutricionales, solamente aportan datos de contenido sin tener presente su biodisponibilidad, mientras que en este estudio se puede decir consumiendo 100 gramos de mango, el consumidor al final del proceso de digestión puede obtener ca. 50 mg de vitamina C y un contenido en polifenoles totales ca. 200 mg eq. Troxol.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aruoma, O.I. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia and Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8 (1), 53–63.
- Barreto, J.C., Trevisan, M.T.S., Hull, W.E., Erben, G., de Brito, E.S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalter, B., & Owen, R.W. (2008). Characterization and quantification of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5599–56.
- BEDCA (Base de datos española de composición de alimentos de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). Consultada en junio de 2015. <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Benzie, I.F.F & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M.J., Oberritter, H., Schulze, M., Stehle, P., & Watzl, B. (2012). Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51, 637–663.
- Bouayed, J., Hoffman, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14–21.
- Brand-Williams W, Cuvelier M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Cilla, A., Perales, S., Lagarda, M.J., Barberá, R., Clemente, G., & Farré, R. (2011). Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 87–94.

- Dorrain, Y.L., D'Arcy, B., & Gisley, M.J. (2015). Mastication effects on carotenoids bioaccessibility from mango fruit tissue. *Food Research International*, 67, 238–246.
- Dorta, E., González, M., Gloria-Lobo, M., Sánchez-Moreno, C., & Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by product extracts from mango (*Mangifera indica* L.) by HPLC–ESI–QTOF–MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57, 51–60.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations database) (2013).
- Frankel, E., & Meyer, A. (1941). The problems of using one–dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- Galán Saúco, Víctor. (2009). El cultivo del mango. Instituto canario de investigaciones agrarias. Ed. Mundi-Prensa Libros, Madrid, España.
- García Márquez, Gabriel. (1985). El amor en los tiempos del cólera. Ed. Bruguera. Barcelona, España.
- Gil A. (2010). Tratado de Nutrición. 2º edición Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Ed. Médica Panamericana.
- Heo, H., Kim, Y., Chung, D., & Kim, D. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104, 87–92.
- Hertog M.G.L. & Hollman P.C.H. (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European Journal of Clinic Nutrition*, 50, 63–71.
- Huang, D., Ou B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 53, 1841–1856.
- Ibarra-Garza, I.P., Ramos-Parra, P.A., Hernández-Brenes, C., & Jacobo-Velázquez, D.A. (2015). Effects of postharvest ripening on the nutraceutical and physicochemical properties of mango (*Mangifera indica* L. cv Keitt). *Postharvest Biology and Technology*, 103, 45–54.

- Jiménez-Ramsey, L.M., Rogler, J.C., & Housley, T.L. (1994). Absorption and distribution of <sup>14</sup>C-labelled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 42, 963–967.
- Jin, P., Wang, S.Y., Wang, C.Y., & Zheng, Y. (2011). Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. *Food Chemistry*, 124, 262–270.
- Kim, Y., Lounds–Singleton, A.J., & Talcott, S.T. (2009). Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 115, 989–993.
- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., & Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, 46, 76–82.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). Fichas de material vegetal del Observatorio de tecnologías probadas. Consultada en junio de 2015.  
<http://www.magrama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2350>
- Mosele, J.I., Macià, A., Romero, M.P., Moltiva, M.J., & Rubio, L. (2015). Application of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. *Food of Functional Foods*, 14, 529–540.
- Ornelas-Paz, J. de J., Yahia, E.M., & Gardea, A.A. (2008). Changes in external and internal color during postharvest ripening of “Manila” and “Ataulfo” mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCI<sup>+</sup> time of flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 145–152.
- Palafox-Carlos, H., Yahiba, E., Islas-Osuna, M.A., Gutierrez-Martínez, P., Robles-Sánchez, M., & González-Aguilar, G.A. (2012). Effect of ripeness stage of mango

fruit (*Mangifera indica* L., cv Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae* 135, 7–13.

Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A. & García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308–2312.

Piljac-Žegarac, J., & Šamec, D. (2011). Antioxidant stability of small fruit in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Research International*, 44, 234–350.

Pyrzyska, K., & Pekal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5, 4288–4295.

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89.

Re, R., Pellegrini, N., Preteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 121–37.

Reglamento (UE) N° 1135/2014 de la comisión de 24 de Octubre de 2014 sobre la autorización de una declaración de propiedades saludables en los alimentos relativa a la reducción del riesgo de enfermedad.

Robles-Sánchez, R.M., Islas-Osuna, M.A., Astiazaran-Garcia, H., Vazquez-Ortiz, F.A., Martin-Belloso, O., Gorinstein, S., & González-Aguilar, G.A., (2009). Quality index consumer acceptability, bioactive compounds, and antioxidant activity of freshcut ataulfo mangoes (*Mangifera indica* L.) as affected by low-temperature storage. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 74, 126–134.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599–606.

- Tharanathan, R.N., Yashoda, H.M. & Prabha, T.N. (2006). Mango (*Mangifera indica* L.), “The King of fruits”—An overview. *Food Reviews International*, 22(2), 95–123.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121–39.
- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D., & Watkins, C.B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 45, 349–357.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152–78.
- Soong, Y-Y., & Barlow, P.J. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97, 524–530.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226–1233.
- The plant list (2013). Version 1.1. Consultada en julio de 2015. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2362842>
- Tomás-Barberán, F.A. & Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 81, 853–876.
- Trópicos (Tropicos.org). Missouri Botanical Garden, Saint Louis Missouri. Consultada en julio 2015. <http://tropicos.org/Name/40013195>
- U.C. Davis. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Website editor Marita Cantwell. Consultada en julio de 2015. [http://postharvest.ucdavis.edu/frutasymelones/Mango\\_702/](http://postharvest.ucdavis.edu/frutasymelones/Mango_702/)

- Valero-Cases, E., & Frutos, M.J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and *in vitro* digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 824-868.
- Villanueva-Tiburcio, J.E., Condezo-Hoyos, L.A., & Asquiere, E.R. (2010). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 30, 151-160.
- Viña, S.Z. & Chaves, A.R. (2006). Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. *Food chemistry*, 94, 68-74.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., & Newmark, H.L. (2001). Inhibition of Carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381-406.
- Yen, G.C., Duh, P.D., & Tsai, H.L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79, 307-13.