

**Efecto de procesamiento sobre la estabilidad  
de polifenoles en extracto de mango  
(*Mangifera indica L.*)**

**Liliana Sofía Reyes Aguilar**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Octubre, 2014

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de procesamiento sobre la estabilidad  
de polifenoles en extracto de mango  
(*Mangifera indica L.*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Liliana Sofía Reyes Aguilar**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
Octubre, 2014

# **Efecto de procesamiento sobre la estabilidad de polifenoles en extracto de mango (*Mangifera indica L.*)**

Presentado por:

Liliana Sofía Reyes Aguilar

Aprobado:

---

Jorge A. Cardona, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de Agroindustria  
Alimentaria

---

Juan A. Ruano, D.Sc.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## **Efecto de procesamiento sobre la estabilidad de polifenoles en extracto de mango (*Mangifera indica* L.)**

**Liliana Sofía Reyes Aguilar**

**Resumen.** El mango, fruta rica en polifenoles que previenen enfermedades. Los polifenoles son estables en pH ácido, al unirse con proteínas pueden llegar a tener alta estabilidad en el proceso digestivo, sin embargo en extractos esta unión hace que se encuentren menos disponibles para su estudio. El objetivo del estudio fue determinar el efecto del pH (inicial y acidificado), temperatura (ambiente y refrigeración) y filtrado (Bentonita y Tierra Deátomacea) en la concentración y estabilidad de polifenoles en extracto de mango (Fase I). Además, se evaluó la estabilidad y concentración de ácido gálico, tánico, taninos de mango y taninos de mango con Albumina de Suero Bovino (ASB), en el proceso de digestión *in vitro* (Fase II). Se usó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y medidas repetidas en el tiempo. Se midió polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, se usó cromatografía líquida (HPLC) para medir la concentración y el comportamiento de los polifenoles. Fase I: Los polifenoles se mantuvieron estables en ambos pH ya que son ácidos, existió remoción de proteínas y de compuestos fenólicos por filtrado, mayor concentración de polifenoles en el control en comparación con tratamientos filtrados. Fase II: La estabilidad a través de digestión *in vitro* se ve influenciada por la hidrólisis ácida sufrida en el estómago como por la degradación de polifenoles en el medio alcalino del intestino, enzimas gástricas solo afectaron proteínas, a mayor hidrólisis mayor absorción de polifenoles. Se recomienda usar espectrómetro de masas con trampa de iones (HPLC-MS) para comprobar hipótesis planteadas.

**Palabras clave:** Digestión *in vitro*, hidrólisis, pH, remoción de proteínas.

**Abstract.** Mango a fruit rich in polyphenols that prevent disease. Polyphenols are stable in acidic pH, binding proteins can have high stability in the digestive process. However, in extracts this union makes polyphenols less available for study. The objective of the study was to determine the effect of pH (initial and acidified), temperature (environment and refrigeration) and filtered (Bentonite and Deatomaceous Earth) in the concentration and stability of polyphenols in mango extract (Phase I). Furthermore, stability and concentration of gallic acid, tannic acid, mango tannin and mango tannin with Bovine Serum Albumin (BSA) in the *in vitro* digestion process was evaluated (Phase II). A completely randomized design with factorial arrangement and repeated measures over time was used. Total polyphenols were measured by the Folin-Ciocalteu method, was used liquid chromatography (HPLC) to measure the concentration and the behavior of the polyphenols. Phase I: The polyphenols were stable in both pH because are acids, removal of proteins and phenolics compounds existed in the filtered treatments, higher concentrations of polyphenols in control treatment compared with filtered treatments. Phase II: Stability through *in vitro* digestion is influenced by the acid hydrolysis in the stomach and the degradation suffered by polyphenols in the alkaline medium of the intestine, gastric enzymes only affected proteins, greater absorption with higher polyphenols hydrolysis. It is recommended using the mass spectrometer ion trap (HPLC-MS) to test hypotheses proposed.

**Keywords:** Hydrolysis, *in vitro* digestion, pH, protein removal.

## CONTENIDO

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| Portadilla .....                          | i         |
| Página de firmas .....                    | ii        |
| Resumen .....                             | iii       |
| Contenido .....                           | iv        |
| Índice de cuadros, figuras y anexos ..... | v         |
| <br>                                      |           |
| <b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>               | <b>1</b>  |
| <b>2 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>       | <b>3</b>  |
| <b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>     | <b>7</b>  |
| <b>4 CONCLUSIONES.....</b>                | <b>24</b> |
| <b>5 RECOMENDACIONES.....</b>             | <b>25</b> |
| <b>6 LITERATURA CITADA .....</b>          | <b>26</b> |
| <b>7 ANEXOS.....</b>                      | <b>31</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros                                                                                                                                                                                                                                                      | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Diseño experimental, estudio de estabilidad de polifenoles en extracto de mango bajo diferentes condiciones de almacenamiento. ....                                                                                                                       | 3      |
| 2. Resultado de análisis de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), en tratamientos de extracto de mango. ....                                                                                                                                                | 8      |
| 3. Resultados de análisis en HPLC en tratamientos de extracto de mango. ....                                                                                                                                                                                 | 13     |
| 4. Resultados de análisis en HPLC del compuesto Éster Mono Galoil Glucosa en tratamientos de extracto de mango. ....                                                                                                                                         | 14     |
| 5. Resultados de análisis en HPLC del compuesto Ácido Gálico en tratamientos de extracto de mango. ....                                                                                                                                                      | 15     |
| 6. Resultados de análisis en HPLC del compuesto Éter Mono Galoil Glucosa en tratamientos de extracto de mango. ....                                                                                                                                          | 16     |
| <br>                                                                                                                                                                                                                                                         |        |
| Figuras                                                                                                                                                                                                                                                      | Página |
| 1. Estructura química de polifenoles presentes en extracto de mango. ....                                                                                                                                                                                    | 11     |
| 2. Cromatograma de muestra analizada en HPLC, mostrando los picos de los polifenoles cuantificados del extracto de mango expuestos a diferentes tratamientos. ....                                                                                           | 12     |
| 3. Resultado de cuantificación total del área bajo picos obtenidos en análisis de HPLC en diferentes tratamientos a lo largo de digestión <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones de temperatura y pH, expresado en equivalente de ácido gálico/ml. .... | 19     |
| 4. Estructura química de algunos taninos. ....                                                                                                                                                                                                               | 21     |
| 5. Estructura química de Ácido gálico y Ácido digálico. ....                                                                                                                                                                                                 | 21     |
| 6. Comparación de cuantificación de picos de diferentes polifenoles presentes en muestras de tomadas a lo largo de digestión <i>in vitro</i> analizadas con HPLC, expresadas en equivalente de mg de ácido gálico/ Kg de tratamiento. ....                   | 23     |
| <br>                                                                                                                                                                                                                                                         |        |
| Anexos                                                                                                                                                                                                                                                       | Página |
| 1. Cuadro para la identificación de compuestos presentes en extracto de mango...                                                                                                                                                                             | 32     |
| 2. Iones identificados en HPLC-MS de Éster Mono Galoil Glucosa. ....                                                                                                                                                                                         | 33     |
| 3. Iones identificados en HPLC-MS de Ácido Gálico. ....                                                                                                                                                                                                      | 33     |
| 4. Iones identificados en HPLC-MS de Éter Mono Galoil Glucosa. ....                                                                                                                                                                                          | 33     |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. Resumen de ANDEVA de análisis realizados Fase I y Fase II del estudio. .... | 34 |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|

## 1. INTRODUCCIÓN

Mango (*Mangifera indica L.*) fruta tropical con una gran importancia económica, forma parte importante de la economía de exportación de muchos países en desarrollo (Terry 2011). Es una drupa, climatérica, con producción estacionaria, el desarrollo fisiológico del fruto se lleva a cabo en un periodo de 16 semanas en el cual aumenta de dimensiones y peso. El peso de la fruta puede variar dependiendo de la variedad, el mango puede llegar a pesar entre 500 y 600 gr. representando de un 80 a 90% el peso de la pulpa, dependiendo de la variedad (Miranda 2013). El color de la cáscara es generalmente una mezcla de pigmentos verdes, rojos y amarillos con una considerable variación en la maduración en función de la variedad. La cáscara del fruto es grueso y glandular y no se consume normalmente, mientras que la pulpa es fibrosa y es altamente variable con respecto al color, sabor y el grado de textura fibrosa (Litz 2009).

Durante la década de 1990, surgió una tendencia a aumentar el consumo de frutas y verduras por su contenido de fitoquímicos (Willett 2010). En las últimas dos décadas el uso de fitoquímicos ha aumentado de manera constante en todo el mundo por los beneficios que puede aportar a la salud (Gurley 2011). El mango y sus subproductos pueden ser utilizados como ingredientes nutracéuticos en alimentos funcionales (Olivera 2012). Estudios han demostrado claramente que una dieta rica en frutas disminuye la probabilidad de contraer enfermedades degenerativas como enfermedades cardiovasculares y cancerígenas (Manach *et al.* 2005).

Las frutas tropicales juegan un papel importante en la dieta humana debido a sus altas concentraciones de vitaminas, minerales, carotenoides, polifenoles y otros componentes bioactivos con actividad antioxidante (Terry 2011). Entre estos compuestos bioactivos se encuentran los compuestos fenólicos que poseen actividad antioxidante, dichos compuestos debido a su composición química, poseen la habilidad de evitar la formación de radicales libres y prevenir o tratar enfermedades, por lo que tienen efectos positivos sobre la salud (Hernández 2007). El mango es una buena fuente de compuestos polifenólicos, tales como diversos flavonoides, ácidos fenólicos y galotaninos. Entre estos compuestos, el ácido gálico y taninos hidrolizables son los principales polifenoles con actividad antioxidantes en mango (Terry 2011). Se ha demostrado que esta fruta es una rica fuente de polifenoles que podrían ser utilizados como antioxidantes naturales para reemplazar algunos aditivos alimenticios sintéticos (Ribeiro *et al.* 2008).

Los polifenoles son sensibles a cambios en pH, estudios han demostrado que existe una degradación oxidativa de dichos compuestos en medios alcalinos, demostrado una mejor estabilidad en pH por debajo de 5.0 (Boza *et al.* 2000). Por lo que aumenta la probabilidad de oxidación durante los procesos digestivos. Debido a que el mango contiene altas



concentraciones de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, anticancerígeno y antimicrobiano (Friedman y Jürgens 2000), es importante entender el comportamiento de estos compuestos durante los procesos digestivos y los cambios radicales en el pH. La diferencia entre el ambiente ácido del estómago (pH 1.0 a 3.0), el intestino delgado (Duodeno: pH 3.8 a 6.6) (Castells y Hernández 2007) y el intestino grueso (pH 7.5 a 8.0) (Tarcha 1990) puede tener un impacto significativo en la estabilidad de los polifenoles ya que estos son muy sensibles a cambios en pH. Basándose en estos cambios de pH durante la digestión se decidió comprobar si los polifenoles se mantienen estables y no se degradan antes de ser absorbidos.

La interacción de los polifenoles del mango con otros compuestos presentes en la fruta, así como macro y micronutrientes es un factor crítico para su estabilización (Siebert 1999). El contenido de proteína en la pulpa de mango es de alrededor de 0.7% (Sergent 1999). Por lo que se decide agregar Albumina de Suero Bovino (ASB), para comprobar si la interacción de proteínas y polifenoles, hacen dichos compuesto más estables durante el proceso de digestión.

Las proteínas y los polifenólicos pueden interactuar para formar complejos solubles inicialmente que crecen a tamaño coloidal a un punto de turbidez o la formación de sedimentos (Siebert *et al.* 1996). La cantidad de turbidez o sedimento formado depende en gran medida de la concentración de proteínas y polifenoles, el tipo de proteína presente, y las condiciones de almacenamiento (Temperatura y pH) (Siebert *et al.* 1996). Esta interacción de compuestos hace que los polifenoles se encuentren menos disponibles para estudios. (Siebert 1999). Por esto se buscó la manera de reducir la unión entre polifenoles y proteínas, removiendo la proteína presente en el extracto con tierra diatomácea (Celite 545<sup>®</sup>) y bentonita. En este estudio se analizaron cambios en la estabilidad de los polifenoles presentes en extracto de mango durante diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura y pH) y se puso a prueba la estabilidad de polifenoles durante la digestión *in vitro* para determinar cómo reaccionan a los cambios del entorno entre el estómago y los intestinos delgado y grueso.

#### **Los objetivos del estudio fueron:**

- Determinar el efecto del pH y temperatura en la concentración de polifenoles en extracto de mango.
- Determinar el efecto de filtrado en la estabilidad y concentración de polifenoles en cada muestra.
- Evaluar la estabilidad y concentración de diferentes tipos de polifenoles a través de digestión *in vitro* bajo diferentes condiciones de pH, enzimas gastrointestinales y adición de la proteína.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del estudio.** El mango fue despulpado en trozos y almacenado al vacío a -18°C, en el año 2012 por el laboratorio de fitoquímicos del Centro de Investigación de Frutas y Verduras en el Departamento de Nutrición y Ciencia de Alimentos en Texas A&M University, CollegeStation, Texas - Estados Unidos. La pulpa de mango congelada fue proporcionada por dicho laboratorio en el cual las fases experimentales del estudio se llevaron a cabo.

**Diseño del estudio.** Para el estudio de estabilidad de polifenoles de extracto de mango bajo diferentes condiciones de almacenamiento se utilizó diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de  $3 \times 2 \times 2$  (Cuadro 1) con tres filtrados del extracto de mango: (control sin filtrado, filtrado con tierra diatomácea y filtrado con bentonita), exposición a diferentes pH durante almacenamiento: (4.2 y 2.5) y dos temperaturas [ambiente (21–24°C) y refrigeración (1–4 °C)]; obteniendo así 12 tratamientos con tres repeticiones para un total de 36 unidades experimentales. Todas las unidades experimentales fueron sometidas a estas condiciones por un periodo de 21 días. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®).

Cuadro 1. Diseño experimental, estudio de estabilidad de polifenoles en extracto de mango bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

| Filtrados                              | Temperatura |        |          |        |
|----------------------------------------|-------------|--------|----------|--------|
|                                        | 21 - 24 °C  |        | 1 - 4 °C |        |
|                                        | pH          |        |          |        |
|                                        | 4.2         | 2.5    | 4.2      | 2.5    |
| <b>Control (sin filtrar)</b>           | TRT 1       | TRT 2  | TRT 3    | TRT 4  |
| <b>Tierra diatomácea (Celite 545®)</b> | TRT 5       | TRT 6  | TRT 7    | TRT 8  |
| <b>Bentonita</b>                       | TRT 9       | TRT 10 | TRT 11   | TRT 12 |

Para la digestión *in vitro* (Fase II) se utilizó diseño completamente al azar (DCA) con 6 medidas repetidas en el tiempo en 4 tratamientos [Ácido Gálico, Ácido tánico, Taninos de mango y Taninos de mango con Albumina de Suero Bovino (ASB) al 1%]. Se realizaron tres repeticiones para un total de 12 unidades experimentales. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®).

**Preparación extracto de mango.** Las muestras proporcionadas se encontraban congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  empacadas al vacío un mango maduro en trozos por bolsa, dichas muestras fueron recolectadas en el 2012. Las muestras se descongelaron en agua caliente a aproximadamente a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, los pedazos de mango fueron licuados por una licuadora de mano (HamiltonBeach<sup>®</sup>) con el objetivo de romper las paredes celulares del mango y dejar los compuestos químicos disponibles.

Se mezcló el puré de mango obtenido con metanol y acetona en proporciones 1:1:1 para solubilizar los compuestos en los solventes. Se dejó reposar por 30 minutos, luego se a filtró con gasa para separar la pulpa del mango de los solventes mezclados con los compuestos químicos del mango. Se evaporaron los solventes en el evaporador rotatorio (Bunchi<sup>®</sup> Rotovapor II) para obtener los compuestos químicos del mango y el agua que queda en el extracto.

Se realizó una segunda extracción utilizando la pulpa que quedo en la gasa en el proceso de filtración, se le adicionó metanol y acetona en proporciones 2:1:1 para realizar una segunda extracción, se dejó reposar 30 minutos, luego fue filtrado utilizando un embudo büchner con papel filtro FisherScientific<sup>®</sup> Q8 y una bomba de vacío. Se evaporaron los solventes en el evaporador rotatorio (Bunchi<sup>®</sup> Rotovapor II), se realizó una tercera extracción utilizando la misma pulpa usada en la segunda extracción y el mismo procedimiento. Finalmente, se mezcló el producto de las tres extracciones con el fin de obtener un solo extracto.

**Filtrado con tierra diatomácea (Celite 545<sup>®</sup>).** Se mezcló la tierra diatomácea con agua acidificada con ácido cítrico (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) al 3%. Se colocó la mezcla en un embudo büchner con papel filtro (FisherScientific<sup>®</sup> Q8) y con la ayuda de una bomba de vacío se creó un corcho de tierra diatomácea en el embudo, se prosiguió a filtrar parte del extracto de mango a través del corcho creado con la ayuda de una bomba al vacío. Se centrifugó (5810 R Eppendorf<sup>®</sup>) el extracto en varios tubos Falcon<sup>®</sup> de 50 L, a 2,000 rpm por cinco minutos y se eliminó el precipitado.

**Filtrado con Bentonita.** Se colocó parte del extracto de mango con bentonita en proporciones 100:1 se mezcló por cinco minutos y se prosiguió a colocar la mezcla en varios tubos Falcon<sup>®</sup> de 50 mL. Se centrifugó la mezcla a 4,000 rpm por diez minutos (5810 R Eppendorf<sup>®</sup>), y se eliminó el precipitado filtrando el extracto con papel filtro (FisherScientific<sup>®</sup> Q8) y una bomba de vacío. Se volvió a centrifugar a 2,000 rpm por cinco minutos y se eliminó el precipitado.

**Ajuste de pH.** Se midió el pH inicial (4.2) de los tratamientos con el pHmetro Symphony<sup>®</sup> B10P. Se a bajó el pH de los extractos utilizando ácido fórmico (Fischer Scientific<sup>®</sup>), hasta obtener todos los tratamientos con el pH deseados (2.5) para la primera parte de este estudio en condiciones de almacenamiento.

**Digestión *in vitro*.** Se tomó una muestra inicial de cada tratamiento (AG, AT, Taninos de mango, Taninos con ASB) de 1.5 mL en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 2 mL (muestra 1) para analizar la concentración inicial de polifenoles de cada tratamiento en HPLC. Se

prosiguió a simular la digestión estomacal colocando 4 mL de Jugo gástrico (pH 1.4) FisherScientific® en un tubo de ensayo con 1 mL de cada tratamiento más 0.3 mL de bicarbonato de sodio (1M NaHCO<sub>3</sub>) para ajustar el pH a 2.0, se homogenizó la mezcla e inmediatamente se tomó otra muestra de 1.0 mL (muestra 2, pH 2.0). Se prosiguió a agregar 3 mL de 100 mM HCL, para iniciar el proceso de digestión estomacal, se tomó otra muestra de 1.0 mL (muestra 3, pH 2.0), la solución fue burbujeada con nitrógeno por 5 minutos para remover el oxígeno presente y simular mejor las condiciones verdaderas de la digestión, se tapó e incubó a 37 °C en movimiento por dos horas. Se enfrió la mezcla en hielo por 1 minuto, y se prosiguió a tomar otra muestra de 1.0 mL (muestra 4, pH 2.0). Se disolvieron las enzimas: extracto biliar porcino (2.4 µg/µL), extracto pancreático porcino (0.4 µg/µL) y lipasa porcina (0.2 µg/µL) (Krook y Hagerman 2012), en 1.5 mL de agua en un tubo Eppendorf® de 2 mL, con la ayuda de sonicador. Se adicionó esta mezcla de agua y enzimas a la muestra enfriada y se agregó 1 mL de 1M NaHCO<sub>3</sub> para alcanzar el pH de 7.5 e iniciar la digestión pancreática, la solución fue burbujeada con nitrógeno por 5 minutos para remover el oxígeno, se tapó e incubó a 37 °C en movimiento por dos horas. Se enfrió la mezcla en hielo por 1 minuto, y se prosiguió a tomar otra muestra de 1.0 mL (muestra 5, pH 7.5). Luego de la digestión pancreática se prosiguió a inactivar las enzimas adicionando 0.1 mL de HCL para acidificar la mezcla, al llegar a pH 2.0. Se prosiguió a tomar la muestra final de 1.0 mL (muestra 6, pH 2.0). Todas las muestras tomadas se sometieron a análisis cromatográfico, para determinar la concentración de polifenoles en cada etapa de la digestión.

**Polifenoles totales (Folin-Ciocalteu).** Se midió la cantidad total de polifenoles solubles en la Fase I de este experimento, a través de la medición de la capacidad reductora de la muestra. Se utilizó 0.1 mL de la muestra a analizar, y a este se le adicionó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (0.25M). Luego se mezcló y dejó reposar por tres minutos. A la mezcla se le adicionó 1 mL de carbonato de sodio 1M (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M), se mezcló y dejó reposar por 7 minutos. Posterior a esto, se adicionó a la mezcla 5 mL de agua, se mezcla y deja reposar 45 minutos, pasado este tiempo se leyó absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 726 nm. Se realizó una curva estándar de ácido gálico utilizando diferentes concentraciones con el objetivo de obtener la pendiente de este y utilizar la formula [1], para calcular la concentración total de polifenoles solubles. Los resultados fueron reportados en mg/kg de equivalentes de ácido gálico.

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{Pendiente}} \times \text{Factor de dilución} \quad [1]$$

**Análisis cromatográfico.** Todas las muestras (Fase I y II) fueron filtradas con un filtro de 0.45 µm y colocadas en viales de 1.5 mL hasta ser analizadas. Se realizó en HPLC Alliance Waters 2695 (Waters Corp., Mildfold, MA) con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Waters 996. Las se realizaron en una columna Acclaim 120-C18 de 250 x 4.6 mm (Dionex, Sunnyvale, CA) con una columna guardia C18. Las fases móviles utilizadas fueron agua acidificada al 0.01% con ácido fórmico (fase A) y metanol acidificado al 0.01% con ácido fórmico (fase B). Los flujos de gradiente utilizados fueron de la fase A de 99% a 85% en 13 minutos; de 85% a 60% en 15 minutos; de 60% a 1% en

21 minutos, en los últimos 3 minutos se mantuvo en 99%, a un flujo durante todo el análisis de 0.8 mL/ minuto. Los compuestos fueron comparados utilizando tiempos de retención y medición del área bajo cada pico mostrado por el cromatograma. Los resultados obtenidos fueron ajustados con la pendiente de una curva estándar de ácido gálico utilizando diferentes concentraciones y los datos se reportaron como equivalente mg-ácido gálico/kg.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Fase I: Estudio de estabilidad de polifenoles de extracto de mango bajo diferentes condiciones de almacenamiento.**

**Polifenoles totales.** Se realizó el ensayo de polifenoles totales conocido como Folin-Ciocalteu (FC) (Cuadro 2), los datos presentados son el resultado de la ecuación [1], de los datos obtenidos por el espectrofotometro a 726 nm. En el estudio realizado se encontraron diferencias estadísticas en el tiempo de almacenamiento de las muestras ( $P < 0.0001$ ). En un estudio se determinó que la interacción de los polifenoles del mango con otros compuestos presentes en la fruta como macro y micronutrientes es un factor crítico para la estabilidad de estos (Siebert 1999). Se sabe que el contenido de proteína del mango es alrededor del 0.7% (Sergent 1999).

En el estudio realizado se encontraron diferencias estadísticas en el tiempo de almacenamiento de las muestras ( $P < 0.0001$ ). En un estudio se determinó que la interacción de los polifenoles del mango con otros compuestos presentes en la fruta como macro y micronutrientes es un factor crítico para la estabilidad de estos (Siebert 1999). Se sabe que el contenido de proteína del mango es alrededor del 0.7% (Sergent 1999).

Los compuestos polifenólicos poseen la capacidad de unión con proteínas gracias a su alto grado de hidroxilación, esta interacción depende mucho de las características de proteínas y fenoles, y de condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo) (Hagerman 1989). Debido a que los fenoles son un excelente donador de hidrógeno posee la habilidad de formar fuertes puentes de hidrógeno con la proteína a través del grupo hidroxilo. (Cannas *et al.* 2014). Las proteínas se pueden precipitar por cambios en el pH (Macarulla y Goñil 1993)

Las pérdidas en el contenido total de polifenoles en el extracto de mango (Control) se asume que es debido a la unión de polifenoles con proteínas las cuales se pudieron precipitar debido al pH de la solución, esta unión reduce el número de grupos hidroxilo que es lo que mide el análisis (Ainsworth y Gillespie 2007). Algunos polifenoles que han pasado por oxidación poseen aún capacidad reductora de metales y por lo tanto pueden ser detectados en análisis (Talcott y Howard 1999). Por lo que los resultados presentados pudieron obtener una variación mayor a la obtenida.

Cuadro 2. Resultado de análisis de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), en tratamientos de extracto de mango.

|          |                | TIEMPO (DÍAS) |                                             |                             |                             |                               |
|----------|----------------|---------------|---------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| T (°C)   | pH             | 0             | 7                                           | 14                          | 21                          |                               |
| 21 - 24  | A <sup>1</sup> | 4.2           | 298 <sup>β</sup> ± 1.56 <sup>Ωabc(yz)</sup> | 281 ± 5.55 <sup>d(z)</sup>  | 298 ± 4.37 <sup>a(y)</sup>  | 349 ± 8.843 <sup>a(x)</sup>   |
|          |                | 2.5           | 290 ± 22.6 <sup>bcd(x)</sup>                | 283 ± 14.5 <sup>bc(x)</sup> | 282 ± 25.8 <sup>bc(x)</sup> | 255 ± 2.060 <sup>cde(y)</sup> |
|          | B              | 4.2           | 265 ± 0.86 <sup>f(x)</sup>                  | 266 ± 3.04 <sup>d(x)</sup>  | 257 ± 3.81 <sup>d(x)</sup>  | 238 ± 1.354 <sup>ef(y)</sup>  |
|          |                | 2.5           | 271 ± 8.66 <sup>cef(x)</sup>                | 268 ± 4.15 <sup>c(x)</sup>  | 261 ± 6.58 <sup>d(y)</sup>  | 243 ± 3.856 <sup>def(z)</sup> |
|          | C              | 4.2           | 273 ± 5.11 <sup>ef(x)</sup>                 | 242 ± 7.37 <sup>d(y)</sup>  | 227 ± 2.43 <sup>e(z)</sup>  | 225 ± 4.385 <sup>fg(z)</sup>  |
|          |                | 2.5           | 209 ± 10.4 <sup>g(x)</sup>                  | 199 ± 3.76 <sup>f(xy)</sup> | 190 ± 6.44 <sup>g(y)</sup>  | 175 ± 4.293 <sup>h(y)</sup>   |
| 1 - 4    | A              | 4.2           | 302 ± 5.41 <sup>ab(x)</sup>                 | 289 ± 3.04 <sup>bc(y)</sup> | 292 ± 4.00 <sup>ac(y)</sup> | 287 ± 4.288 <sup>b(y)</sup>   |
|          |                | 2.5           | 309 ± 6.88 <sup>a(x)</sup>                  | 305 ± 4.94 <sup>a(x)</sup>  | 293 ± 15.1 <sup>ab(y)</sup> | 285 ± 6.483 <sup>bc(y)</sup>  |
|          | B              | 4.2           | 284 ± 3.27 <sup>cde(x)</sup>                | 284 ± 2.65 <sup>bc(x)</sup> | 268 ± 5.74 <sup>cd(x)</sup> | 268 ± 4.580 <sup>bcd(x)</sup> |
|          |                | 2.5           | 294 ± 5.53 <sup>abc(x)</sup>                | 294 ± 7.84 <sup>ab(x)</sup> | 281 ± 7.02 <sup>bc(x)</sup> | 260 ± 10.22 <sup>de(y)</sup>  |
|          | C              | 4.2           | 270 ± 11.5 <sup>ef(x)</sup>                 | 263 ± 5.29 <sup>e(x)</sup>  | 263 ± 1.58 <sup>d(x)</sup>  | 260 ± 0.445 <sup>cde(x)</sup> |
|          |                | 2.5           | 209 ± 6.50 <sup>g(x)</sup>                  | 206 ± 26.1 <sup>f(x)</sup>  | 206 ± 1.90 <sup>f(x)</sup>  | 205 ± 3.804 <sup>g(x)</sup>   |
| C.V. (%) |                |               |                                             | 4.20                        |                             |                               |

<sup>1</sup>A: extracto de mango (Control). B: extracto de mango filtrado con Bentonita. C: extracto de mango filtrado con tierra diatomácea (Celite 545®).

<sup>β</sup>Media aritmética. <sup>Ω</sup>Desviación estándar. <sup>a-g</sup>Separación de media entre tratamientos en un día en específico. <sup>x-z</sup>Separación de medias a través del tiempo en cada tratamiento. C.V: coeficiente de variación.

Por otra parte se puede observar que el tratamiento control a temperatura ambiente sufrió un aumento a lo largo del tiempo, un estudio con manzana sufrió un aumento en polifenoles en diferentes condiciones de almacenamiento, se atribuyó a la variedad de la manzana, ya que al comparar varias sólo sucedía con una variedad en específico (Napolitano *et al.* 2004), en otro estudio se observó un aumento significativo en ácidos fenólicos presentes en zanahoria sometida a diferentes condiciones de almacenamiento aeróbico (Klaiber *et al.* 2005). El comportamiento usual de los polifenoles en diferentes condiciones de allanamiento es la tendencia a disminuir por acción de degradación por oxidación (Mullen *et al.* 2002, Vallejo *et al.* 2003, Gliszczynska-Swiglo y Tyrakowska 2003).

Se encontraron diferencias estadísticas entre pH ( $P < 0.0001$ ). Los polifenoles son compuestos ácidos, debido a la naturaleza del grupo fenólico y del grupo carboxilo (Ocampo *et al.* 2008), estudios han demostrado que existe una degradación oxidativa de dichos compuestos en medios alcalinos, demostrado una mejor estabilidad en pH por debajo de 5.0 (Boza *et al.* 2000). Ambos pH utilizados son ácidos por lo que los polifenoles presentes en las muestras presentaron un comportamiento estable en los pH utilizados en los tratamientos.

Por otro lado se obtuvieron diferencias estadísticas entre temperaturas de almacenamiento ( $P < 0.0001$ ). Se puede observar, que los tratamiento sometido a temperatura de refrigeración (1 – 4 °C), se mantuvo más estable en comparación al mismo tratamiento sometido a temperatura ambiente (21 – 24 °C), ya que estudios han demostrado que la unión entre proteínas u otro compuesto con polifenoles siempre ocurrirá, sin embargo en temperaturas de refrigeración las moléculas poseen un movimiento más lento, por lo que estas reacciones tardaran más en suceder (Fang *et al.* 2007). Por lo que las muestras sometidas a temperatura de refrigeración también presentaron una disminución en el tiempo sin embargo las muestras almacenadas a temperatura ambiente lo presentaron en un tiempo menor.

Se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos sometidos a distintos tipos de filtrado ( $P < 0.0001$ ). Según la separación de medias realizada con LSmeans para evaluar la interacción entre los distintos factores en el estudio, se puede observar que las muestras del control (extracto sin filtrar), obtuvieron la mayor cantidad de polifenoles desde el inicio del estudio hasta el final. Esto pudo ocurrir ya que la bentonita posee la capacidad de remoción de hasta el 40% de proteína en vinos (Robinson *et al.* 2012), de acuerdo a un estudio también provoca una disminución significativa en la cantidad de fenoles, debido a que poseen una gran afinidad por el intercambio iónico entre partículas, la reducción obtenida en agua con una baja concentración de fenoles (0.2 a 1.4 mg/mL, (González *et al.* 2007)), fue del 90 al 100%, dependiendo de las condiciones de manejo de la reacción (Shen 2002), tales como pH de la solución (actúa mejor en pH alcalino), tiempo de contacto entre la arcilla y la muestra, concentración inicial de fenoles en la muestra, concentración de bentonita empleada y temperatura (mejor en temperaturas altas), afectan la afinidad entre componentes de bentonita y la muestra (Senturk *et al.* 2009), la remoción de polifenoles y partículas depende principalmente de la concentración inicial (Senturk *et al.* 2009).



En este estudio los tratamientos filtrados con tierra bentonita obtuvieron una remoción de polifenoles del 11% en promedio, comparando la muestras del día 0 del control (pH 4.2) con la muestra filtrada con bentonita del día 0 (pH 4.2). La tierra diatomácea posee la habilidad de remover de 2 a 5% de los polifenoles totales presentes en la muestra y del 21 a 23% de proteína en una vaya (Bayberry) (Fang *et al.* 2007), sin embargo el porcentaje de remoción de polifenoles depende de la concentración inicial de la muestra (Senturk *et al.* 2009). En este estudio existió una disminución de polifenoles en este tratamiento del 8% en promedio, comparando la muestras del día 0 del control (pH 4.2) con la muestra filtrada con tierra diatomácea (Celite 545®) del día 0 (pH 4.2). La muestra filtrada con tierra deatomácea (Celite 545®) con un pH de 2.5, presentó una cantidad inicial menor de polifenoles en comparación con el resto de muestras, esto pudo suceder ya que primero se filtró la muestra con el pH inicial (4.2), y luego se filtró la muestra destinada a ser acidificada, por lo que pudo existir una reducción en la porosidad inicial del filtro causando una mayor retención de compuestos para la muestra filtrada después, por lo que existió una menor cantidad de polifenoles iniciales.

**Análisis cromatográfico.** Se realizó este análisis con el objetivo de tener una cuantificación de polifenoles más exacta y corroborar los datos obtenidos en el análisis anterior, ya que el método de Folin-Ciocalteu es basado en la reacción colorimétrica al reducir un grupo hidroxilo con los componentes del reactivo, donde la reacción es medida en el espectrofotómetro (Magalhaes *et al.* 2006). Con este método pueden cuantificarse otras sustancias presentes en la muestra con capacidad reductora (Ainsworth y Gillespie 2007) por lo que es un método inexacto. Por lo que se utiliza el análisis de cromatografía líquida para cuantificar de manera más precisa y específica, y corroborar los datos obtenidos con el método de Folin-Ciocalteu

El mango posee ácido gálico y taninos hidrolizables los cuales son en su mayoría galotaninos. (Kim *et al.* 2007, Talcott *et al.* 2005). En estudios recientes se muestra la presencia de dos mono-galoil-glucosa identificados con una unión éster o éter del ácido gálico a una glucosa, siendo la forma éster que presenta una concentración mayor en relación a la forma éter en extracto de mango (Krenek *et al.* 2014). Se identificó mediante HPLC-MS los componentes ácido gallico, éster mono galoil glucosa y éter mono galoil glucosa, cada componente posee una configuración de iones específica (Krenek *et al.* 2014), por lo que para realizar la identificación se buscó la presencia de iones específicos en los compuestos (Figura 1).

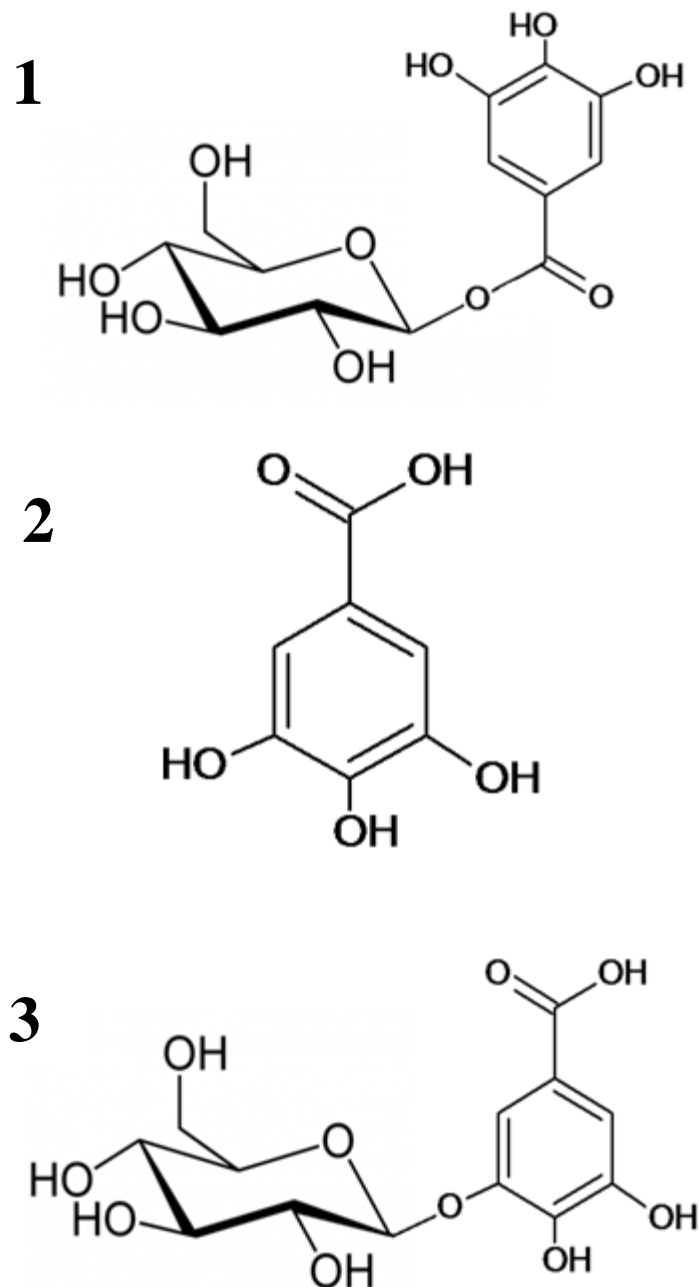


Figura 1. Estructura química de polifenoles presentes en extracto de mango.  
 1: Ester Mono Galoil Glucosa, 2: Ácido Gálico, 3: Eter Mono Galoil Glucosa.

Se identificaron estos compuestos con el objetivo de realizar una cuantificación más específica de los polifenoles y poder observar cambios en el tiempo y en el comportamiento de estos compuestos; también se cuantificaron el área de todos los picos presentes en los cronogramas con un espectra ( $\lambda$ ) de 280 nm (Figura 2).

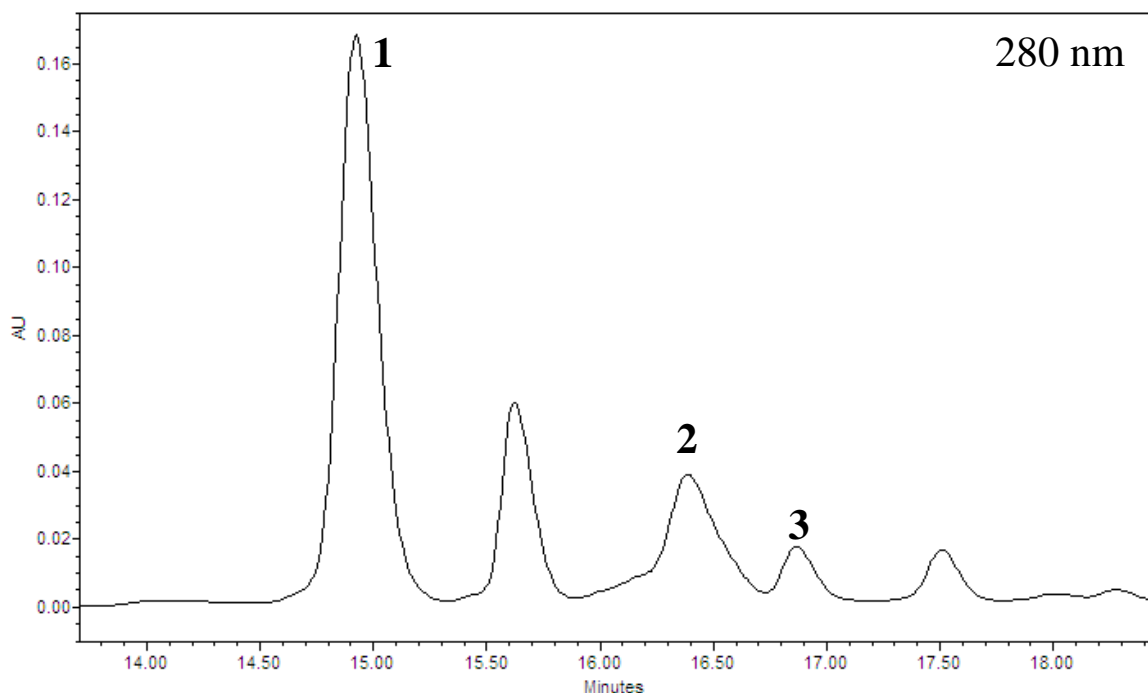


Figura 2. Cromatograma de muestra analizada en HPLC, mostrando los picos de los polifenoles cuantificados del extracto de mango expuestos a diferentes tratamientos.  
<sup>1</sup>Ester-mono-galoil-glucosa. <sup>2</sup>Ácido-gálico. <sup>3</sup>Eter-mono-galoil-glucosa.

Se tomaron muestras de los tratamientos en el día 0 y 21 para ser analizadas en HPLC, se cuantificaron todos los picos presentes en cada muestra (Cuadro 3), para observar en comportamiento en general de la muestra a través del tiempo, bajo las diferentes condiciones de almacenamiento.

En este estudio no se encontraron diferencias estadísticas en temperaturas de almacenamiento ( $P=0.4309$ ), ya que este método es más específico en el sentido que sólo son analizados los compuestos que pasan por el filtro de  $0.45\ \mu\text{m}$ , utilizado para purificar las muestras, dichos filtros poseen la capacidad de retención de proteínas presentes en la muestra (ICTSL s.f), por lo cual es un método más preciso para analizar polifenoles y observar su comportamiento en el tiempo, los polifenoles presentes en muestra son muy estables a degradación química, es decir interactúan poco con otros compuestos químicos presentes en la muestra (Navarro y Navarro 2013).

Se encontraron diferencias estadísticas a través del tiempo ( $P = 0.0023$ ), sin embargo se realizó separación de medias por el método LSmeans para evaluar interacciones entre factores que influyen en el estudio y ninguna de las muestras presentaron cambios a través del tiempo a excepción del tratamiento filtrado con bentonita a pH 4.2. Esto se puede atribuir al error humano o a un aumento por el comportamiento de la variedad del mango. Este método es más preciso en el sentido que se mide únicamente los picos correspondientes a polifenoles estos fueron identificados debido a la forma del espectro arrojado por HPLC, sin embargo puede existir cierta variación, debido a que la medición de cada pico es de manera manual, y existen varios métodos para realizarla, por lo que no

siempre se puede asegurar que fue realizado precisamente sin medir una porción de otro compuesto. En este estudio se obtuvo un coeficiente de variación de 11.08%, por lo que los datos poseen un amplio rango de variación sin encontrar diferencias estadísticas entre sí.

Cuadro 3. Resultados de análisis en HPLC en tratamientos de extracto de mango.

|          |                | TIEMPO (DÍAS) |                                         |                             |
|----------|----------------|---------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
| T(°C)    | pH             | 0             | 21                                      |                             |
| 21 - 24  | A <sup>1</sup> | 4.2           | 118 <sup>β</sup> ± 37.8 <sup>a(x)</sup> | 120 ± 5.04 <sup>a(x)</sup>  |
|          |                | 2.5           | 98.5 ± 5.56 <sup>abc(x)</sup>           | 105 ± 5.39 <sup>cd(x)</sup> |
|          | B              | 4.2           | 84.5 ± 26.7 <sup>bc(y)</sup>            | 117 ± 2.69 <sup>a(x)</sup>  |
|          |                | 2.5           | 91.5 ± 3.18 <sup>bc(x)</sup>            | 97.7 ± 1.86 <sup>e(x)</sup> |
|          | C              | 4.2           | 89.8 ± 2.60 <sup>bc(x)</sup>            | 101 ± 0.55 <sup>d(x)</sup>  |
|          |                | 2.5           | 75.3 ± 1.45 <sup>c(x)</sup>             | 81.7 ± 0.26 <sup>f(x)</sup> |
| 1 - 4    | A              | 4.2           | 102 ± 21.4 <sup>ab(x)</sup>             | 111 ± 0.51 <sup>b(x)</sup>  |
|          |                | 2.5           | 98.1 ± 2.19 <sup>abc(x)</sup>           | 97.7 ± 1.98 <sup>c(x)</sup> |
|          | B              | 4.2           | 92.8 ± 2.46 <sup>abc(x)</sup>           | 93.3 ± 1.63 <sup>e(x)</sup> |
|          |                | 2.5           | 99.7 ± 6.06 <sup>abc(x)</sup>           | 98.3 ± 0.66 <sup>e(x)</sup> |
|          | C              | 4.2           | 93.2 ± 2.62 <sup>abc(x)</sup>           | 98.6 ± 0.23 <sup>e(x)</sup> |
|          |                | 2.5           | 75.2 ± 3.31 <sup>c(x)</sup>             | 73.8 ± 0.25 <sup>f(x)</sup> |
| C.V. (%) |                |               | 11.08                                   |                             |

<sup>1</sup>A: extracto de mango (Control). B: extracto de mango filtrado con Bentonita. C: extracto de mango filtrado con tierra diatomácea (Celite 545®).

<sup>β</sup> Media aritmética (De polifenoles en la muestra). <sup>Ω</sup> Desviación estándar. <sup>a-c</sup> Separación de media entre tratamientos en un día en específico. <sup>x-y</sup> Separación de medias a través del tiempo en cada tratamiento. C.V: coeficiente de variación.

Se encontraron diferencias estadísticas entre pH (P = 0.0002). Los polifenoles son compuestos ácidos (Ocampo *et al.* 2008). Sin embargo ambos pH utilizados son ácidos por lo que los polifenoles presentes en las muestras presentaron un comportamiento estable (Navarro y Navarro 2013) en los pH utilizados en los tratamientos.

Las muestras tuvieron diferencias estadísticas entre tratamientos (P <0.0001), de acuerdo a la separación de medias realizada se puede observar que las muestras del control (extracto sin filtrar) poseen la mayor concentración de polifenoles en comparación a los otros tratamientos, ya que la bentonita posee la capacidad de retención de polifenoles (Shen 2002) al igual que la tierra diatomácea (Fang *et al.* 2007). Las muestras filtradas con tierra diatomácea presentan una menor cantidad de compuestos en el tratamiento con pH de 2.5, ya que estos quedaron atrapados en el filtro.

Se realizó la cuantificación de ácido gálico, éster mono galoil glucosa y éter mono galoil glucosa, por separado de cada componente con el objetivo de poder obtener resultados aún más específicos. De acuerdo a la literatura consultada se esperaba encontrar mayor concentración de éster mono galoil glucosa en comparación a otros componentes (Krenek *et al.* 2014), en las muestras tomadas si se obtuvo una mayor concentración de este compuesto. Se presentaron diferencias estadísticas entre cada compuesto.

El estudio estadístico mostró que el compuesto éster mono galoil glucosa (Cuadro 4) no presento diferencias significativas en distintos pH ( $P = 0.1672$ ), ni entre temperaturas ( $P= 0.7338$ ) demostrando que los polifenoles son compuestos muy estables (Navarro y Navarro 2013). Al igual que los resultados presentados con anterioridad se observan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P <0.0001$ ) se puede observar que este compuesto se encontró en mayor cantidad en la muestra control, teniendo una leve disminución en las muestras filtradas. Las muestras presentaron diferencias estadísticas en el tiempo ( $P=0.0051$ ), sin embargo en la separación de medias por LSmeans estas no presentaron diferencias estadísticas, este compuesto no presentó diferencias estadísticas a lo largo del tiempo, sólo la muestra filtrada con bentonita a pH 4.2 a temperatura ambiente, esto pudo ocurrir por error humano o por la variedad del fruto.

Cuadro 4. Resultados de análisis en HPLC del compuesto Éster Mono Galoil Glucosa en tratamientos de extracto de mango.

|          |                | TIEMPO (DÍAS)                  |                                           |                               |
|----------|----------------|--------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| T (°C)   | pH             | 0                              | 21                                        |                               |
| 21 - 24  | A <sup>1</sup> | 4.2                            | 29.3 <sup>β</sup> ± 9.39 <sup>Ωa(x)</sup> | 28.8 ± 0.41 <sup>a(x)</sup>   |
|          |                | 2.5                            | 26.4 ± 2.05 <sup>ab(x)</sup>              | 28.9 ± 0.16 <sup>a(x)</sup>   |
|          | B              | 4.2                            | 22.8 ± 7.34 <sup>bcd(y)</sup>             | 28.5 ± 0.55 <sup>abc(x)</sup> |
|          |                | 2.5                            | 25.5 ± 0.49 <sup>abcd(x)</sup>            | 27.4 ± 1.07 <sup>d(x)</sup>   |
| C        | 4.2            | 23.3 ± 0.50 <sup>abcd(x)</sup> | 23.1 ± 0.09 <sup>f(x)</sup>               |                               |
|          | 2.5            | 19.8 ± 0.89 <sup>cd(x)</sup>   | 21.2 ± 0.10 <sup>g(x)</sup>               |                               |
| 1 - 4    | A              | 4.2                            | 25.5 ± 4.74 <sup>abcd(x)</sup>            | 27.9 ± 0.14 <sup>bcd(x)</sup> |
|          |                | 2.5                            | 26.3 ± 0.93 <sup>abc(x)</sup>             | 28.6 ± 0.10 <sup>ab(x)</sup>  |
|          | B              | 4.2                            | 24.4 ± 0.74 <sup>abcd(x)</sup>            | 27.7 ± 0.65 <sup>cd(x)</sup>  |
|          |                | 2.5                            | 27.5 ± 2.34 <sup>ab(x)</sup>              | 28.0 ± 0.23 <sup>bcd(x)</sup> |
|          | C              | 4.2                            | 24.2 ± 0.57 <sup>abcd(x)</sup>            | 26.3 ± 0.06 <sup>e(x)</sup>   |
|          |                | 2.5                            | 19.9 ± 1.32 <sup>d(x)</sup>               | 21.3 ± 0.40 <sup>g(x)</sup>   |
| C.V. (%) |                | 10.77                          |                                           |                               |

<sup>1</sup>A: extracto de mango (Control). B: extracto de mango filtrado con Bentonita. C: extracto de mango filtrado con tierra diatomácea (Celite 545®).

<sup>β</sup> Media aritmética (De polifenoles en la muestra). <sup>Ω</sup> Desviación estándar. <sup>a-c</sup> Separación de media entre tratamientos en un día en específico. <sup>x-y</sup> Separación de medias a través del tiempo en cada tratamiento. C.V: coeficiente de variación.

En ácido gálico (Cuadro 5.) lo que existe un aumento a lo largo del tiempo de este compuesto lo que explica la diferencia estadística obtenida a lo largo del tiempo ( $P < 0.0001$ ), lo cual puede ser producto de la oxidación (Mullen *et al.* 2002, Vallejo *et al.* 2003, Gliszczynska-Swiglo y Tyrakowska 2003), de otro compuesto que dan como resultado un aumento en ácido gálico (Snow *et al.* 1998). Este compuesto presenta diferencias entre temperaturas de almacenamiento ( $P < 0.0001$ ) en las muestras almacenadas a temperatura ambiente los compuestos poseen un movimiento más rápido por lo que las reacciones químicas pueden ocurrir en ambos tratamientos sin embargo a temperatura ambiente se muestra más rápido (Fang *et al.* 2007), este compuesto se presentó en mayor cantidad en la muestra control, y en menor cantidad en la muestra filtrada con tierra diatomea, comportamiento que va acorde con el estudio estadístico donde se encontraron diferencias entre tratamientos ( $P = 0.0061$ ), sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas entre pH ( $P = 0.2491$ ) ya que son compuestos de naturaleza estable (Navarro y Navarro 2013).

Cuadro 5. Resultados de análisis en HPLC del compuesto Ácido Gálico en tratamientos de extracto de mango.

|          |                | TIEMPO (DÍAS) |                                       |                          |
|----------|----------------|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| T (°C)   | pH             | 0             | 21                                    |                          |
| 21 - 24  | A <sup>1</sup> | 4.2           | $8.22^{\beta} \pm 2.41^{\Omega a(x)}$ | $8.43 \pm 0.63^{cd(x)}$  |
|          |                | 2.5           | $7.33 \pm 0.46^{ab(x)}$               | $7.84 \pm 0.10^{bc(x)}$  |
| 21 - 24  | B              | 4.2           | $6.09 \pm 1.94^{bcde(y)}$             | $14.8 \pm 0.74^{a(x)}$   |
|          |                | 2.5           | $6.30 \pm 0.25^{bcde(y)}$             | $12.8 \pm 0.43^{ab(x)}$  |
|          | C              | 4.2           | $5.11 \pm 0.48^{e(y)}$                | $11.3 \pm 0.06^{abc(x)}$ |
|          |                | 2.5           | $5.18 \pm 0.24^{de(y)}$               | $11.0 \pm 0.06^{abc(x)}$ |
| 1 - 4 °C | A              | 4.2           | $5.99 \pm 0.49^{bcde(y)}$             | $13.3 \pm 2.14^{abc(x)}$ |
|          |                | 2.5           | $7.30 \pm 0.93^{ab(x)}$               | $6.13 \pm 0.14^{de(x)}$  |
|          | B              | 4.2           | $6.73 \pm 0.20^{abcd(x)}$             | $6.02 \pm 0.15^{de(x)}$  |
|          |                | 2.5           | $6.95 \pm 0.22^{abc(x)}$              | $5.57 \pm 0.10^{de(x)}$  |
|          | C              | 4.2           | $5.65 \pm 0.59^{cde(x)}$              | $4.65 \pm 0.17^{de(x)}$  |
|          |                | 2.5           | $5.43 \pm 0.29^{cde(x)}$              | $3.97 \pm 0.05^{e(x)}$   |
| C.V. (%) |                | 23.28         |                                       |                          |

<sup>1</sup>A: extracto de mango (Control). B: extracto de mango filtrado con Bentonita. C: extracto de mango filtrado con tierra diatomea (Celite 545®).

<sup>β</sup> Media aritmética (De polifenoles en la muestra). <sup>Ω</sup> Desviación estándar. <sup>a-c</sup> Separación de media entre tratamientos en un día en específico. <sup>x-y</sup> Separación de medias a través del tiempo en cada tratamiento. C.V: coeficiente de variación.

El compuesto éter mono galoil glucosa presentó un comportamiento más estable debido a su naturaleza ya que los enlaces éter poseen comportamiento más estable, lo que va acorde al estudio estadístico donde no se presentaron diferencias estadísticas de pH ( $P = 0.2242$ ), temperatura ( $P = 0.7414$ ) ni en el tiempo ( $P = 0.5622$ ), lo cual es comprobado con

la separación de medias realizada de los tratamientos a través del tiempo. Si se pueden observar diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P = 0.0296$ ), donde las muestras con bentonita presentaron un comportamiento similar al control (extracto sin filtrar) el cual contenía la cantidad mayor de este compuesto, al mismo tiempo dichas muestras filtradas con bentonita presentan comportamiento similar a las muestras filtradas con tierra diatomácea las cuales contenían una menor cantidad del compuesto.

Cuadro 6. Resultados de análisis en HPLC del compuesto Éter Mono Galoil Glucosa en tratamientos de extracto de mango.

|                |   | TIEMPO (DÍAS) |                                        |                         |
|----------------|---|---------------|----------------------------------------|-------------------------|
| T (°C)         |   | pH            | 0                                      | 21                      |
| A <sup>1</sup> |   | 4.2           | $2.27^{\beta} \pm 0.70^{\Omega ab(x)}$ | $2.22 \pm 0.04^{bc(x)}$ |
|                |   | 2.5           | $2.04 \pm 0.13^{b(x)}$                 | $2.38 \pm 0.14^{a(x)}$  |
| 21 - 24        | B | 4.2           | $1.75 \pm 0.56^{b(x)}$                 | $2.14 \pm 0.05^{bc(x)}$ |
|                |   | 2.5           | $1.97 \pm 0.07^{ab(x)}$                | $2.22 \pm 0.07^{b(x)}$  |
|                | C | 4.2           | $1.80 \pm 0.77^{b(x)}$                 | $1.87 \pm 0.02^{ef(x)}$ |
|                |   | 2.5           | $1.47 \pm 0.07^{b(x)}$                 | $1.66 \pm 0.09^{g(x)}$  |
|                | A | 4.2           | $1.64 \pm 0.23^{a(x)}$                 | $1.99 \pm 0.09^{de(x)}$ |
|                |   | 2.5           | $2.02 \pm 0.05^{b(x)}$                 | $2.08 \pm 0.07^{cd(x)}$ |
| 1 - 4 °C       | B | 4.2           | $1.87 \pm 0.10^{b(y)}$                 | $1.98 \pm 0.13^{de(x)}$ |
|                |   | 2.5           | $2.09 \pm 0.18^{b(x)}$                 | $1.86 \pm 0.07^{ef(x)}$ |
|                | C | 4.2           | $1.84 \pm 0.04^{b(x)}$                 | $1.83 \pm 0.11^{f(x)}$  |
|                |   | 2.5           | $1.55 \pm 0.09^{b(x)}$                 | $1.21 \pm 0.01^{h(x)}$  |
| C.V. (%)       |   |               | 47.98                                  |                         |

<sup>1</sup>A: extracto de mango (Control). B: extracto de mango filtrado con Bentonita. C: extracto de mango filtrado con tierra diatomácea (Celite 545®).

<sup>β</sup> Media aritmética (De polifenoles en la muestra). <sup>Ω</sup> Desviación estándar. <sup>a-c</sup> Separación de media entre tratamientos en un día en específico. <sup>x-y</sup> Separación de medias a través del tiempo en cada tratamiento. C.V: coeficiente de variación.

**Fase II: Estabilidad de polifenoles del mango durante digestión *in vitro*.** En la fase I de este estudio se determinó que los polifenoles poseen una mayor estabilidad en pH ácido (<5.0), por lo que se esperó en este estudio obtener una mayor estabilidad de estos compuestos en las fases de la digestión *in vitro* donde el pH es ácido.

**Análisis cromatográfico.** Este análisis se realizó con el objetivo de obtener resultados más precisos, de este modo se cuantificaron los polifenoles presentes en la muestra y se observó el efecto que tuvo el proceso de digestión *in vitro* sobre las muestras (Figura 3). Los tratamientos utilizados fueron ácido tánico (AT) en una solución de 378 mg/L, ácido gálico (AG) en solución de 400 mg/L, taninos de mango (Tan) con una concentración de 374 mg/L y taninos de mango con 1% de albumina de suero bovino (ASB) (Tan-ASB).

Se observó la concentración inicial de polifenoles presentes en cada tratamiento antes de iniciar el proceso de digestión (0.00 horas), para tener un parámetro de comparación con las diferentes etapas del estudio. En el tratamiento Tan-ASB, se obtuvo un aumento significativo en comparación con el tratamiento Tan desde el inicio del proceso de digestión, debido a hidrólisis ácida causada en las proteínas por el pH (3.5) de la muestra (Sabbatina s.f.).

En la muestra dos (0.17 horas), cada tratamiento fue adicionado a jugo gástrico, y el pH fue ajustado a 2.0 con bicarbonato de sodio. En la digestión gástrica se produce la reducción de partículas del alimento para ayudar a liberar los polifenoles y algunos ácidos fenólicos para poder ser absorbidos en su forma libre, el pH gástrico puede afectar la estabilidad de algunos polifenoles los cuales pueden ser modificados en el ambiente ácido del estómago, pueden sufrir una hidrólisis (Ross *et al.* 2013)

En mango se han identificado diferentes compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos como mangiferin, ácidos gálico (-m digálico y ácidos-m trigálico), galotaninos, quercetina, isoquercetina, ácido elágico, y  $\beta$ -glucogalin se encuentran entre los ácidos fenólicos ya identificados en la pulpa de mango (Schieber *et al.* 2000). Alrededor del 75% del contenido total de taninos de mango se ha determinado que son taninos hidrolizables como los galotaninos (Masibo y He 2008). Estos compuestos son una glucosa unida a uno o más ácidos gálicos mediante enlaces éster (Bravo 1998). En los cromatogramas obtenidos de los tratamientos Tan y Tan-ASB se observa la presencia de galotaninos, estos compuestos fueron identificados al comparar los cromatogramas iniciales de estos tratamientos, con los obtenidos en un estudio donde se realizó análisis cromatográfico de extracto de mango (Krenek 2009).

Por otra parte los flavonoides que se encuentran en el mango incluyen catequina, epicatequina, quercetina, isoquercetina (quercetina-3-glucósido), fisetina y astragalín (kaempferol-3-glucósido) (Masibo y He 2008). Los glucósidos de flavonol predominantes encontrados en mango son quercetina 3-galactósido, quercetina-3-glucósido y la quercetina 3-arabinósido, también existe la presencia de quercetina aglicona (Schieber *et al.* 2000). Estudios hechos con polifenoles de oliva sugieren que durante la digestión gástrica ocurre la hidrólisis ácida de glucósidos dejando como productos agliconas que son absorbidos en el estómago (Walle *et al.* 2000, Tarko *et al.* 2009, Tsao 2010, Ross *et al.* 2013), por lo que se pudo observar un aumento en los resultados de los tratamientos



Tan y Tan-ASB. Algunos glucósidos de flavonol pueden permanecer intactos (sin hidrolizar) en este proceso y entrar así a la digestión en el intestino delgado (Ross *et al.* 2013). También se puede atribuir el aumento de estos tratamientos en esta fase debido a una hidrólisis en los galotaninos, la cual es observable en los cromatogramas obtenidos.

Por otro lado AT es simplemente anhídrido de ácido gálico, cuando se oxida se convierte en ácido gálico en el estómago antes de la absorción (Masibo y He 2008), debido a una hidrólisis ácida producida por el ambiente del estómago (Ross *et al.* 2013). Mientras AG se comienza a degradar debido al ambiente ácido (Parisa *et al.* 2007), la degradación de ácido gálico es por medio de descarboxilación (Snow *et al.* 1998), la reacción de degradación mediante oxidación da como resultado la formación de sustancias polimerizadas (Manach *et al.* 2004) por lo que se observa una reducción en esta fase.

La muestra Tan-ASB, presentó un aumento significativo de los compuestos, esto puede deberse a la exposición a un medio ácido dando las condiciones adecuadas para una hidrólisis. De acuerdo a estudios, ASB sufre una degradación por hidrólisis a pH 2.0 (Estey *et al.* 2006) y también debido a que el jugo gástrico utilizado contenía pepsina, enzima encargada en el proceso de digestión (hidrólisis) de proteínas mediante ruptura del enlace peptídico entre aminoácidos (Teijón *et al.* 2006), ya que a mayor hidrólisis de proteína mayor digestibilidad de éstas (Del Pino 2003). Los aminoácidos libres pudieron unirse a los compuestos fenólicos creando una mayor cantidad de compuestos que fueron cuantificados.

En la muestra 3 (0.17 horas) se adicionó ácido clorhídrico (100 mM HCl), con el objetivo de iniciar la digestión estomacal. Sin embargo, este ambiente no causó cambios significativos en los tratamientos, ya que el cambio en el ambiente fue leve. La muestra 4 (2.33 horas), fue tomada luego de que los tratamientos fueran sometidos a incubación a 37°C en constante movimiento por un periodo de 2 horas, este ambiente tampoco causó cambios en las muestras. La hidrólisis ácida de los compuestos fenólicos causada por el ambiente ácido del estómago puede aumentar levemente dependiendo del tiempo de exposición a este ambiente (Ross *et al.* 2013).

En la siguiente etapa del proceso de digestión *in vitro* (Muestra 5, 4.33 horas) se prosiguió a simular la digestión pancreática, la cual ocurre en el intestino delgado para lo que se adiciono extracto biliar porcino, extracto pancreático porcino y lipasa porcina, se elevó el pH hasta 7.5 y se incubaron los tratamientos a 37°C en movimiento constante por dos horas. El extracto pancreático utilizado contenía tripsina, amilasa y lipasa, ribonucleasa, y proteasa, producida por las células exocrinas del páncreas porcino (Sigma Aldrich®), el extracto biliar contenía glicina y taurina conjugados de ácido hiodesoxicólico y otras sales biliares (Sigma Aldrich®).

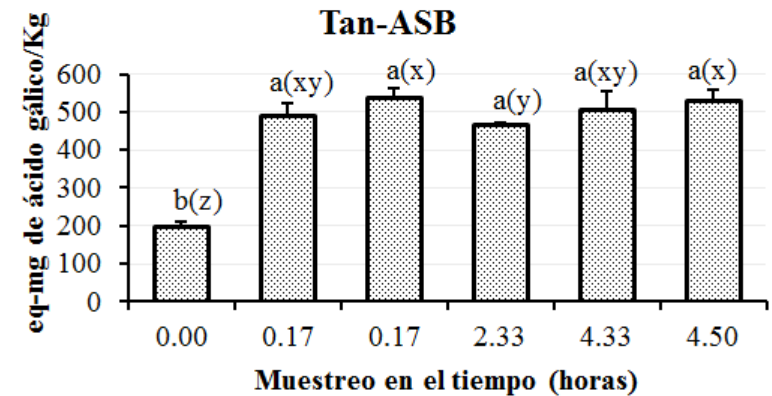
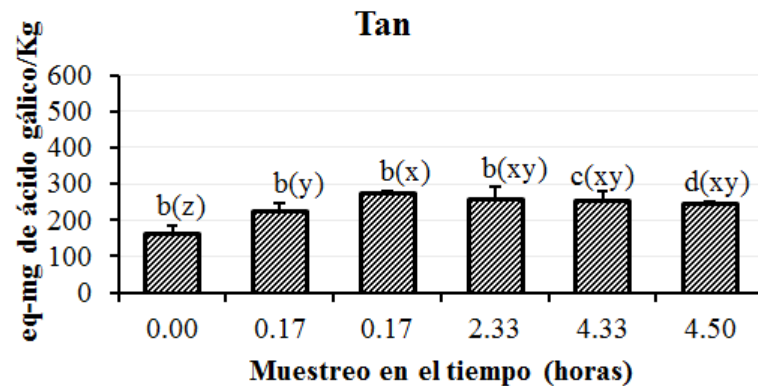
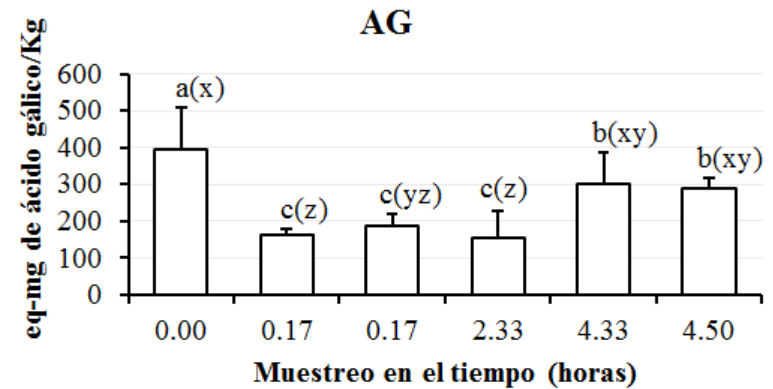
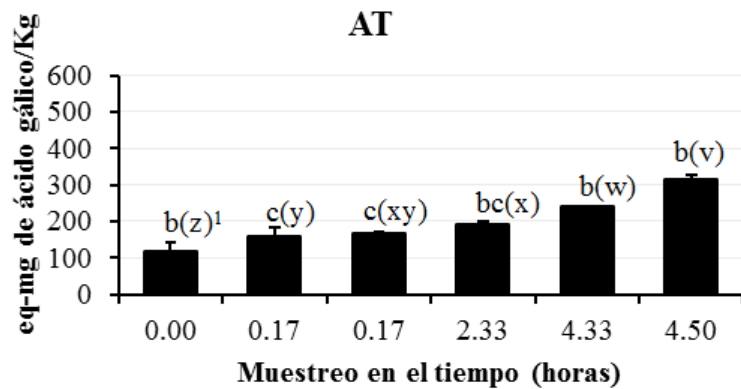


Figura 3. Resultado de cuantificación total del área bajo picos obtenidos en análisis de HPLC en diferentes tratamientos a lo largo de digestión *In Vitro* bajo diferentes condiciones de temperatura y pH, expresado en equivalente de ácido gálico/ml. AT: ácido tánico, AG: ácido gálico. Tan: tánicos de mango Tan-ASB: tánicos de mango con Albumina de Suero Bovino. <sup>a-c</sup>Separación de medias para comparación de un tiempo en específico contra todos los tratamientos. <sup>v-z</sup> Separación de medias para comparar barras del mismo color dentro de un mismo tratamiento a través del tiempo.

Los compuestos glucósidos de flavonol que permanecieron intactos en el proceso de digestión gástrica, al entrar en el digestivo intestinal son sometidos a una desglicosilación, un aglicón puede ser absorbido en el intestino delgado, sin embargo la mayoría de polifenoles presentes en la comida se encuentran como glucosidos o polímeros, y no pueden ser absorbidos directamente, por eso deben ser hidrolizados en el intestino debido a las enzimas presentes en el intestino como  $\beta$ -Glucosidasa, y la microflora (Wallet *et al.* 2000, Prior 2003, Tarko *et al.* 2009, Ross *et al.* 2013). Por lo que los flavonoles y ácidos fenólicos son conjugados en metabolitos en el intestino delgado para una mejor absorción (Spencer 2003).

Sin embargo en este estudio no estuvieron presentes las enzimas responsables de esta reacción de desglicosilación, los compuestos estuvieron expuestos a un medio alcalino donde son poco estables y sufren un proceso de oxidación en un pH arriba de 6.5, donde un aumento puede ocurrir por degradación de otros compuestos (Kosinka *et al.* 2012). En fresa ocurrió un aumento de ácido elágico producto de la degradación de elagitaninos por la exposición de condiciones alcalinas del intestino (Gil-Izquierdo *et al.* 2002), lo mismo sucedió en estudios con granada (Etcheverry *et al.* 2012), por lo que se crea la hipótesis que esto sucedió en el estudio.

La absorción de algunos polifenoles en el intestino delgado es alrededor de 10 al 20%, compuesto como ácidos fenólicos como ácido gálico son bien absorbidos (Ross *et al.* 2013). Según estudios los compuestos como ácidos fenólicos sufren un incremento de un 100% debido a la formación de nuevos compuestos producto de la hidrólisis sufrida en el intestino delgado (Ross *et al.* 2013), siendo esto la explicación del aumento de los tratamientos AG y AT en esta fase. Mientras otros compuestos como flavonoles sufren un aumento de 25% (Ross *et al.* 2013), explicando el leve incremento en los tratamientos Tan y Tan-ASB.

Por otra parte la tripsina es una proteasa que presenta su mayor eficiencia a pH 7.0, la función principal de las proteasas es romper el enlace peptídico que existe entre proteínas, se considera una hidrolasa (Martínez 2009). Por lo que se forman nuevos compuestos con los aminoácidos libres y los polifenoles en el tratamiento Tan-ASB.

Para la última etapa de este estudio (4.5 horas) se redujo el pH hasta 2.0, al acidificar el medio algunos procesos de hidrólisis siguen sucediendo en la muestra TA por lo que se observa un aumento en esta, mientras que las otras muestras permanecen estables, y no ocurre aumento o disminución significativa en los tratamientos GA, Tan y Tan-BSA, estos tratamientos al haber sufrido una hidrólisis en sus componentes desde el momento inicial del proceso de digestión *in vitro* se encuentran demasiado hidrolizados los compuestos presentes en la muestra por lo que no sigue ocurriendo este proceso o formación de nuevos compuestos.

Los galotaninos (Figura 4) son los taninos hidrolizables presentes en la muestra, los cuales sufrieron una ruptura de los enlaces éster entre los ácidos gálicos con la glucosa (Bravo 1998), también en los enlaces formados entre ácidos gálicos entre un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, para formar ácido digálico (Figura 5) (Masibo y He 2008). Investigaciones han sugerido que entre más grande es un compuesto polifenólico, menor

es la probabilidad de que este sea absorbido y se encuentre biodisponible, en la hidrólisis de los galotaninos surgieron nuevos productos por lo que se puede decir que ocurrió un incremento en ácido gálico, mono-galoil glucosa, penta-galoil, tetra-galoil y hepta-galoil glucósidos (Krenek 2009)

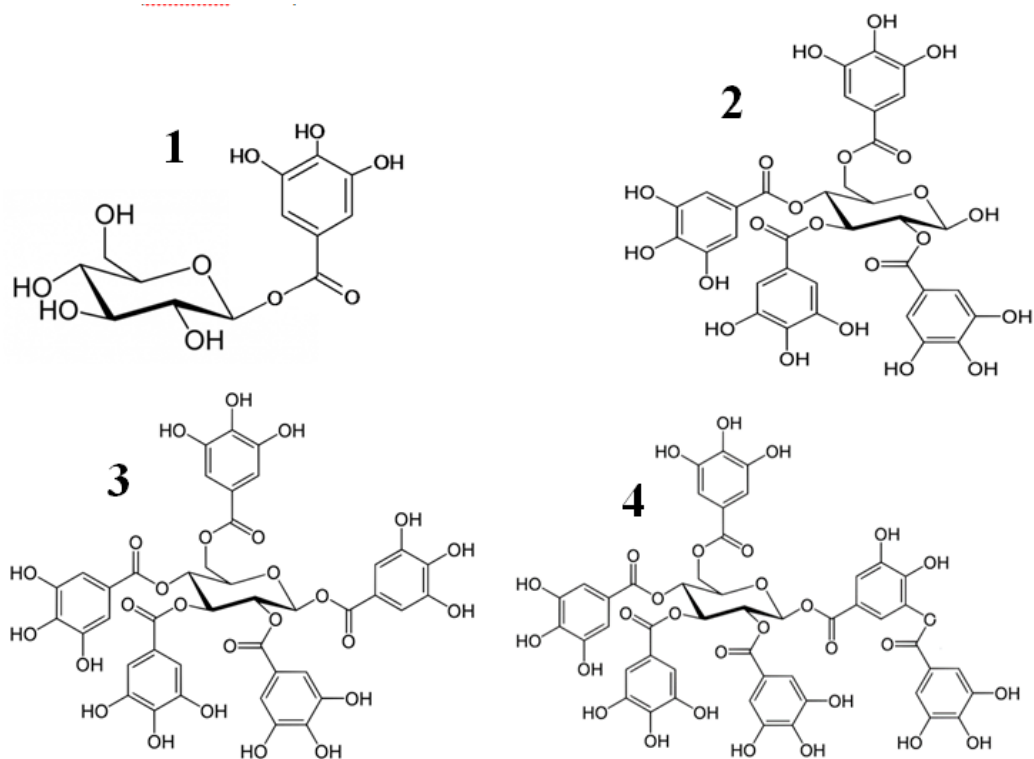


Figura 4. Estructura química de algunos taninos.

<sup>1</sup>Mono-galoil-glucosa. <sup>2</sup>Tetra-galoil-glucosa. <sup>3</sup>Penta-galoil-glucosa. <sup>4</sup>Hexa-galoil-glucosa

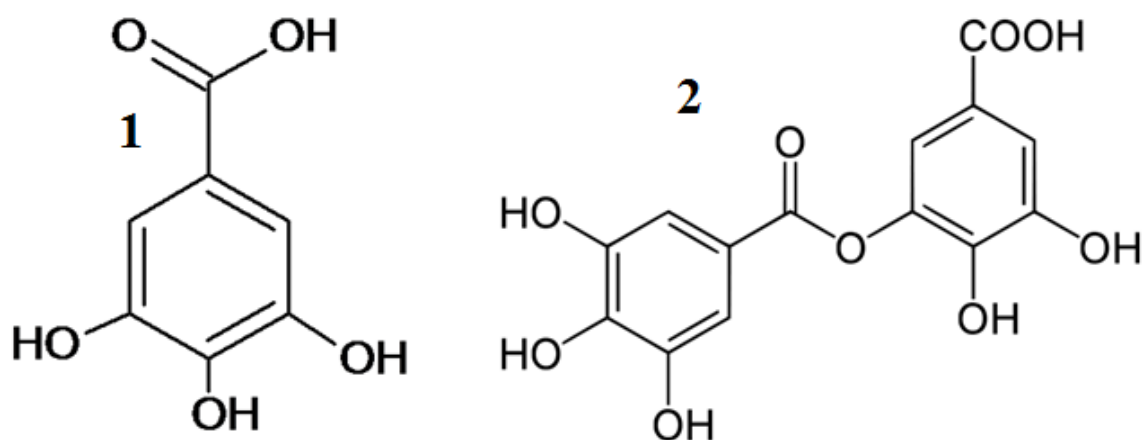


Figura 5. Estructura química de Ácido gálico y Ácido digálico

En las primeras cuatro muestras existió una hidrólisis ácida, se obtuvo un aumento en los análisis ya que existió formación de nuevos compuestos mediante la hidrólisis que causo

al mismo tiempo una disminución de galotaninos. Esto ocurrió en los tratamientos AT Tan y Tan-ASB. En las siguientes muestras existió una hidrólisis alcalina producto del incremento del pH hasta 7.0, por eso se obtuvo aumento en la cuantificación de compuestos en los mismos tratamientos. El tratamiento Tan-ASB presenta un mayor resultado ya que contenía proteínas por lo que existe mayor formación de nuevos compuestos, ya que no solo existe hidrolización de galotaninos sino también hidrólisis de proteínas por acción enzimática y ácida.

Los polifenoles pueden variar en su forma desde moléculas simples como el ácido gálico, hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos. La composición química de los taninos es normalmente cinco o más ácidos gálicos ligados a través de un enlace éster a una o más azúcares. Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) es el azúcar más común, por lo que ocurre una asociación entre este azúcar y fenoles (Bravo 1998). Esta asociación puede ser hidrolizada y causar la formación de nuevos compuestos, por lo que se puede observar la formación de nuevos picos en el cromatograma al finalizar el día 21, mientras se ve la reducción de los galotaninos (Figura 6).

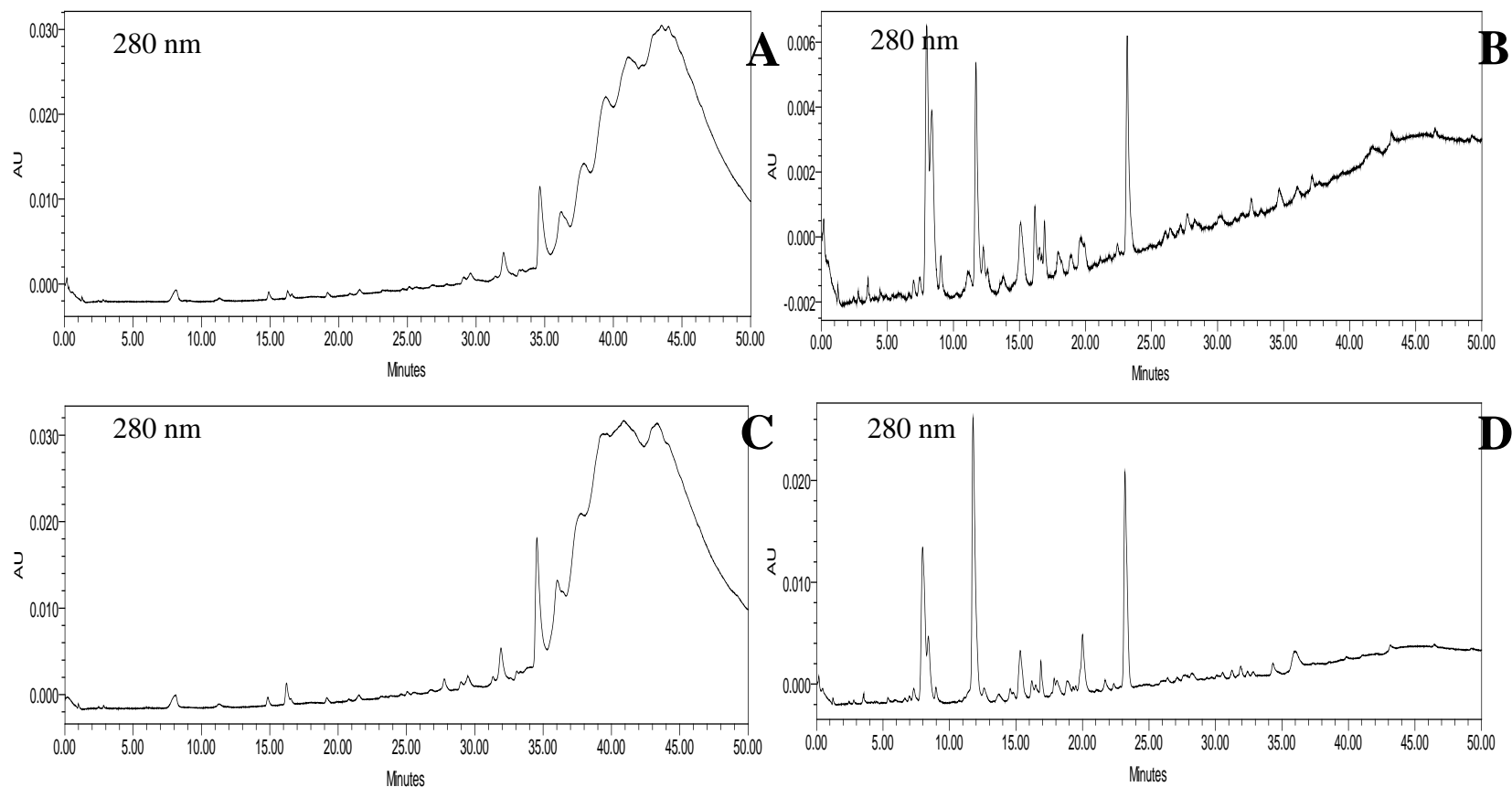


Figura 6. Comparación de cuantificación de picos de diferentes polifenoles presentes en muestras de tomadas a lo largo de digestión *in vitro* analizadas con HPLC, expresadas en equivalente de mg de ácido gálico/ Kg de tratamiento.

A: Taninos de mango día 0, B: Taninos de mango día 2, C: Taninos de mango con ASB día 0, D: Taninos de mango con ASB día 21.

## 4. CONCLUSIONES

- Los polifenoles presentaron un comportamiento estable a los pH utilizados 4.2 y 2.5, y en temperatura de refrigeración, ya que presentaron menores reacciones químicas.
- El proceso de filtrado no solo causó la remoción de proteínas en el extracto de mango, si no que Bentonita removió el 11% de polifenoles y Tierra diatomácea (Celite 545<sup>®</sup>) removió el 8% de polifenoles presentes en la muestra.
- La concentración de ácido gálico disminuyó a lo largo del proceso digestivo, debido a la degradación provocada por el ambiente ácido del ambiente gástrico simulado en la digestión *in vitro*.
- El proceso de hidrólisis que ocurre en el ambiente del estómago simulado durante la digestión *in vitro*, aumentó la concentración de polifenoles y la formación de nuevos compuesto en los tratamientos de ácido tánico, tanino de mango y tanino de mango con Albúmina de Suero Bovino (ASB).
- La concentración de polifenoles y otros compuestos en todos los tratamientos sometidos al proceso de digestión *in vitro* tendió a disminuir debido a la degradación provocada por el ambiente alcalino del intestino delgado simulado.

## 5. RECOMENDACIONES

- Determinar los cambios en los polifenoles del mango sufridos a consecuencia de la hidrólisis presentada en ambos estudios usando un espectrómetro de masas con trampa de iones (HPLC-MS).
- Realizar el proceso de digestión *in vitro* directamente con pulpa de mango, para determinar si los compuestos presentes en la matriz alimenticia causan algún efecto diferente en las reacciones presentadas.
- Comprobar las hipótesis presentadas en el estudio de digestión *in vitro*, con estudios usando un espectrómetro de masas con trampa de iones (HPLC-MS).



## 6. LITERATURA CITADA

Ainsworth, E. A. y K. M. Gillespie. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Publishing Group. Nature protocols 2(4):875 – 877.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews 56(11):317 – 333.

Boza, A., L. Arus, O. Garcia y A.J. Nuñez-Selles. 2000. Preformulación de crema y ungüento a partir de un extracto seco de la corteza de *Mangifera indica* L. Información Tecnológica 11(4): 129.

Cannas, A., B. I. Giner-Chavez y P. J. Van Soest. 2014. Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules (En línea). Consultado 20 de Agosto de 2009. Disponible en <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>

Castells, S. y M. Hernández. 2007. Farmacología en enfermería. Madrid, España, Elsevier. 14 p.

Del Pino, V. H. y F. M. Lajolo. 2003. Inhibitory effect of carioca bean tannins on phaseolin digestibility assessed by two multi-enzymatic systems. Campinas: Food Science and Technology 23(1).

Estey, T., J. Kang., S. P. Schwendeman. y J. F. Carpenter. 2006. BSA Degradation under Acidic Conditions: A Model for Protein Instability during Release from PLGA Delivery Systems. Journal Of Pharmaceutical Sciences 95(7): 1626 – 1639.

Etcheverry, p., M. A. Grusak. y L. E. Fleige., 2012. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D, and E. Frontiers in Physiology. Vol. 3.

Fang, Z., M. Zhang., W. Du. y J. Sun.2007. Effect of Fining and Filtration on the Haze Formation in Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(1): 113 – 119.

- Friedman, M. y H.S Jürgens. 2000. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 2101–2110.
- Gil-Izquierdo, A., P. Zafrilla. y F. A. Tomás-Barberán. 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology* 214(2): 155-159.
- Gliszczynska-Swiglo, A. y B. Tyrakowska. 2003. Quality of Commercial Apple Juices Evaluated on the Basis of the Polyphenol Content and the TEAC Antioxidant Activity. *Journal of Food Science* 68(5): 1844–1849.
- González R, C., F. Q. Guerrero., B. G. Almendárez. y C. Regalado. 2007. Métodos de inmovilización de peroxidasa de nabo y su aplicación en la destoxificación de soluciones fenólicas. Querétaro, México. Universidad Autónoma de Querétaro. 1 – 4 p.
- Gurley, B.J. 2011. Emerging Technologies for Improving Phytochemical Bioavailability: Benefits and Risks. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89(6): 915-919.
- Hagerman, A. E. 1989. Chemistry of tannin-protein complexation. New York, USA. Chemistry and significance of condensed tannins. 323 – 324 p.
- Hernández, L. R., 2007. Alimentos Nutracéuticos. Xalapa, Veracruz, México. Universidad Veracruzana. 39 p.
- ICTSL. S.F. Millipore. Filtración de laboratorio: Guía de productos (En línea). Consultado 23 de Agosto de 2014. Disponible en <http://www.ictsl.net/downloads/millipore2009.pdf>
- Kim, Y., J. K. Brecht. y S. T. Talcott. 2007. Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water immersion and controlled atmosphere storage. *Food Chemistry* 105(4): 1327–1334 .
- Klaiber, R.G., S. Baur., A. Koblo. y R. Carle. 2005. Influence of washing treatment and storage atmosphere on phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic acid content of minimally processed carrot sticks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 1065–1072.
- Kosinska, A., Y. Xie., S. Diering., J. Héritier. y W. Andlauer. 2012. Stability of Phenolic Compounds Isolated from Cocoa, Green Tea and Strawberries in Hank's Balanced Salt Solution under Cell Culture Conditions. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 62(2): 91-96.

Krenek, K. A. 2009. HPLC and mass spectroscopic characterization of Mango (*mangifera indica* L.) Gallotannins following Enzymatic hydrolysis. Undergraduate Research Texas A&M University.

Krenek, K. A., R. C. Barnes. y S. T. Talcott. 2014. Phytochemical Composition and Effects of Commercial Enzymes on the Hydrolysis of Gallic Acid Glycosides in Mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(39):9515 – 9521.

Krook, M. A. y A. E. Hagerman. 2012. Stability of polyphenols epigallocatechingallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International* 49(1):112– 116.

Litz, R.E. 2009. *The Mango: Botany, Production and Uses*. Second edition. Florida, United State, CAB International. 3- 4 p.

Macarulla, J. M. y F. M. Goñil. 1993. *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural*. Barcelona, España, Editorial Reverte. 294 p.

Magalhaes. L, M., M. A. Segundo., S. Reis., F. C. Lima. y A.S. Rangel. 2006. Automatic Method for the Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(15): 5241 – 5246.

Manach, C., A. Scalbert., C. Morand., C. Rémésy. y L. Jiménez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5):727 – 747.

Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert. y C. Rémésy. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 230S–242S.

Martínez, A. 2009. *El Alzheimer: ¿Qué sabemos de...?*. Madrid, España. Editorial CSIC. Vol. 2, 11 p.

Masibo, M. y Q. He. 2008. Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7(4): 309–319.

Miranda, N., 2013. *La esmeralda del Papaloapan*. Bloomington, Indiana, Estados Unidos. Editorial Palibrio. 217 – 218 p.

Mullen, W., A.J. Stewart., M. E. Lean., P. Gardner., G. G. Duthie. y A. Crozier. 2002 . Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18):5197– 5201.

Napolitano, A., A. Cascone., G. Graziani., R. Ferracane., L.Scalfi., C. Di Vaio., A. Ritieni. y V. Fogliano. 2004. Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6526-6531.

Navarro, G. y Navarro, S. 2013. *Química Agrícola Química Del Suelo Y De Nutrientes Esencial*. Madrid, España. Editorial Mundi-Prensa Libros. 508 p.

Ocampo, R., L. A. Ríos., L. A. Betancur. y D. M. Ocampo. 2008. *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*. Manizales, Caldas, Colombia. Universidad de Caldas.

Olivera, E.M., 2012. *Evaluación de subproductos obtenidos de la elaboración de jugo de mango y guayaba como fuente de fibra antioxidante*. Querétaro, México. Universidad Autónoma de Querétaro.

Parisa, S., H, Reza., G, Elham. y J, Rashid. 2007. Effect of Heating, UV Irradiation and pH on Stability of the Anthocyanin Copigment Complex. *Pakistan Journal of Biological Science* 10(2): 267-272.

Prior, R, L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition* 78(3): 570S-578S.

Ribeiro. S.M.R., L.C.A. Barbosa., J.H. Queiroz., M. Knödler. y A. Schieber. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* 110(3): 620 – 626.

Robinson, E., N. Scrimgeour., M. Marangon., R. Muhlack., P. Smith., P. Godden. y D. Johnson. 2012. Beyond bentonite. *Wine & Viticulture Journal* 27(6): 24 - 30.

Ross, R. W., V. R. Preedy. y S. Zibadi. 2013. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier, Academic Press. 594 – 596 p.

Sabbatina, V. S.F. *Biología Celular Humana*. Capítulo 2: Composición química de los seres vivos (En línea). Consultado 23 de Agosto de 2014. Disponible en [http://www.genomasur.com/BCH/BCH\\_libro/capitulo\\_02.htm](http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_02.htm)

Schieber, A., W. Ullrich. y R. Carle. 2000. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1(2):161-166.

Senturk, H.B., D. Ozdes., A. Gundogdu., C. Duran. y M. Soylak. 2009. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto organomodified Tirebolu bentonite: equilibrium, kinetic and thermodynamic study. *Journal of Hazardous Materials* 172(1):353-362.

Sergent, E. 1999. El cultivo del mango (*Mangifera indica L.*): botánica, manejo y comercialización. Ed. CDCH, UCV. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 80 p.

Shen. Y. 2002. Removal of phenol from water by adsorption–flocculation using organobentonite. *Water Research* 36(5):1107–1114.

Siebert, K. J., N. V. Troukhanova. y P. Y. Lynn. 1996. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 80 – 85.

Siebert, K. J. 1999. Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 353 – 362.

Snow, J., D. A. Crerar., G. Grissom. y T. C. Key. 1998. Aqueous thermal degradation of gallic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52(2): 341–344.

Spencer. J. P. 2003. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition* 33(10):3255S-3261S.

Talcott, S. T. y L. R. Howard. 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Science* 47(5):2109 - 2115.

Talcott, S. T., J. P. Moore., A. J. Lounds-singleton. y S. S. Percival. 2005. Ripening Associated Phytochemical Changes in Mangos (*Mangifera indica*) Following Thermal Quarantine and Low-Temperature Storage. *Journal of Food Science* 70(5):C337– C341.

Tarcha, P.J. 1990. *Polymers for Controlled Drug Delivery*. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, United State. CRC Press. 41 p.

Tarko, T., A. Duda-Chodak., P. Sroka., P. Satora. y J. Michalik. 2009. Transformations of Phenolic Compounds in an in vitro Model Simulating the Human Alimentary Tract. Transformation of Phenolics in Alimentary Tract, *Food Technol. Biotechnol* 47(4):456–463.

Teijón, J. M., A. G. Pertierra., D. B. Gaitán., C. V. Gutiérrez., C. M. Oltras. y J. Ramírez. 2006. *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid, España. Editorial Tebar. Vol. 1. 243 p.

Terry, L. 2011. Health-Promoting Properties of Fruits and Vegetables. Preston, United Kingdom, Editorial CAB International. 352-363 p.

Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Journal Nutrients* 12(2):1231-1246.

Vallejo, F., F. Tomas-Barberan. y C. Garcia-Viguera. 2003. Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10): 3029–3034.

Walle, T., Y. Otake., U.K. Walle. y F. A. Wilson. 2000. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *The Journal of Nutrition* 130(11): 2658-2661.

Willett, W. C. 2010. Fruits, Vegetables, and Cancer Prevention: turmoil in the Produce Section. *Journal of the National Cancer Institute* 102(8): 510- 511.

## 7. ANEXOS

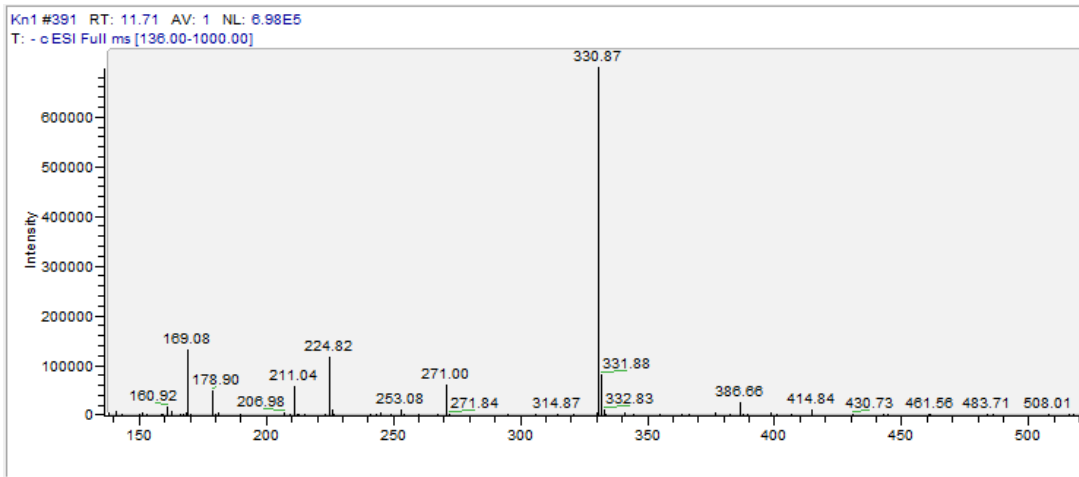
Anexo 1. Cuadro para la identificación de compuestos presentes en extracto de mango.

| peak no. | RT (min) | Compound                                                   | $\lambda_{\max}$ (nm) | [M-H] <sup>-</sup> (m/z) | MS/MS (m/z) <sup>1</sup>   | Concentration (mg/kg) <sup>2</sup> |
|----------|----------|------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 1        | 21.67    | ester <sup>3</sup> -mono-galloyl glucoside                 | 278                   | 331.2                    | 271.1, 169.2, 211.2, 125.3 | 37.67 ± 0.56                       |
| 2        | 24.55    | gallic acid                                                | 271                   | 169.2                    | 125.3                      | 1.74 ± 0.10                        |
| 3        | 27.55    | galloyl di-glucoside                                       | 274                   | 493.1                    | 313.22                     | 0.45 ± 0.01                        |
| 4        | 29.93    | ether <sup>3</sup> -mono galloyl glucoside                 | 254, 298              | 331.2                    | 169.2, 125.4               | 3.82 ± 0.13                        |
| 5        | 30.3     | <i>p</i> -hydroxybenzoic acid glycoside                    | 256                   | 299.1                    | 239, 179, 137, 209         | 18.49 ± 0.72                       |
| 6        | 35       | coumaric glycoside                                         | 295                   | 324.8                    | 163.2                      | 1.61 ± 0.05                        |
| 7        | 36.52    | dihydrophaseic acid glucoside                              | 265                   | 443.5                    | 237.0, 219.1, 281.1, 425.3 | 2.60 ± 0.04                        |
| 8        | 37.35    | ferulic acid hexoside                                      | 290, 314              | 355                      | 193.2, 149.3               | 0.91 ± 0.02                        |
| 9        | 41.17    | sinapic acid hexoside-pentoside                            | 251, 283, 328         | 517.1                    | 385.1, 205.3, 223.3        | 0.13 ± 0.01                        |
| 10       | 41.42    | sinapic acid hexoside                                      | 247, 327              | 385.1                    | 223.0, 153.2, 205.3, 161.0 | 0.164 ± 0.01                       |
| 11       | 43.93    | dihydrophaseic acid glucoside                              | 267                   | 443.4                    | 263.1, 219.1, 143.2        | 0.47 ± 0.03                        |
| 12       | 44.55    | hydroxy-dimethyl decadiene-dioic acid glucopiranosylester* | 275                   | 403.2                    | 241.0, 343.0, 197.2        | 1.78 ± 0.09                        |
| 13       | 46.22    | hydroxy-dimethyl decadiene-dioic acid glucopiranosylester* | 274                   | 403.2                    | 241.1, 343.1, 197.1        | 1.25 ± 0.13                        |
| 14       | 48.23    | abscisic acid glucoside                                    | 273                   | 425                      | 263.0, 219.2, 189.1        | 0.57 ± 0.02                        |
| 15       | 52.02    | eriodictyol- <i>O</i> -dihexoside*                         | 277                   | 611.4                    | 449.2, 287.2, 389.1        | trace                              |
| 16       | 52.62    | eriodictyol- <i>O</i> -hexoside*                           | 278                   | 449.3                    | 287.2, 389.1, 269.2, 227.1 | trace                              |
| 17       | 61.98    | abscisic acid                                              | 265                   | 263.2                    | 219.2, 153.2, 151.2        | 0.55 ± 0.04                        |

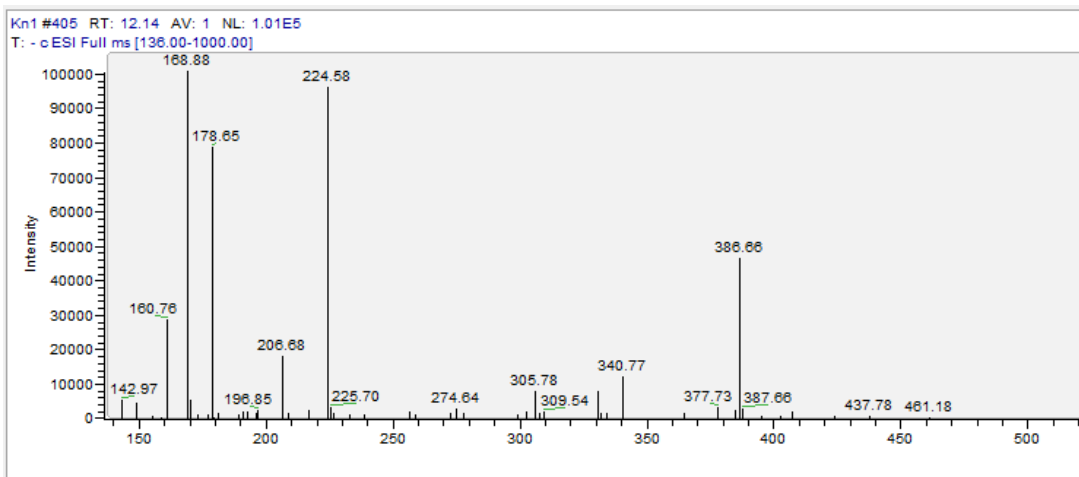
Caracterización tentativa y semi-cuantificación de los compuestos presentes en pulpa de mango. var. Keitt (Krenek *et al.* 2009)

<sup>1</sup> Ordenado por predominio de iones en el espectro. <sup>2</sup> Valores representan las medias y los errores estándar de tres repeticiones. <sup>3</sup> Designa el tipo de enlace glicosídico. \* Identificación tentativa basada en las características espectrales y similitudes de fragmentación ESI-MSN.

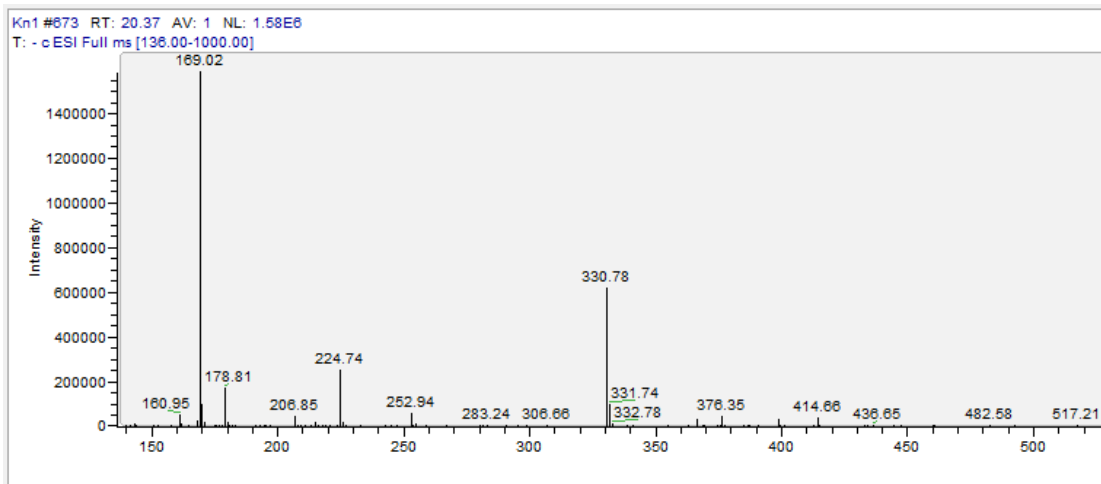
## Anexo 2. Iones identificados en HPLC-MS de Éster Mono Galoil Glucosa.



## Anexo 3. Iones identificados en HPLC-MS de Ácido Gálico.



## Anexo 4. Iones identificados en HPLC-MS de Éter Mono Galoil Glucosa.





Anexo 5. Resumen de ANDEVA de análisis realizados Fase I y Fase II del estudio.

| <b>Analisis</b>                              | <b>Modelo</b> | <b>Probabilidad</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>Coefficiente de variación</b> |
|----------------------------------------------|---------------|---------------------|----------------------|----------------------------------|
| <b>Polifenoles Torales (Folin-Ciocalteu)</b> | PH            | <.0001              | 0.93                 | 4.20                             |
|                                              | TEMPERATURA   | <.0001              |                      |                                  |
|                                              | TRT           | <.0001              |                      |                                  |
|                                              | TIEMPO        | <.0001              |                      |                                  |
| <b>HPLC (General)</b>                        | PH            | 0.0002              | 0.92                 | 11.08                            |
|                                              | TEMPERATURA   | 0.4309              |                      |                                  |
|                                              | TRT           | <.0001              |                      |                                  |
|                                              | TIEMPO        | 0.0023              |                      |                                  |
| <b>HPLC: Éster Mono Galoil Glucosa</b>       | PH            | 0.1672              | 0.66                 | 10.77                            |
|                                              | TEMPERATURA   | 0.7338              |                      |                                  |
|                                              | TRT           | <.0001              |                      |                                  |
|                                              | TIEMPO        | 0.0051              |                      |                                  |
| <b>HPLC: Ácido Gálico</b>                    | PH            | 0.2491              | 0.78                 | 23.38                            |
|                                              | TEMPERATURA   | <.0001              |                      |                                  |
|                                              | TRT           | 0.0061              |                      |                                  |
|                                              | TIEMPO        | <.0001              |                      |                                  |
| <b>HPLC: Éter Mono Galoil Glucosa</b>        | PH            | 0.2242              | 0.62                 | 47.98                            |
|                                              | TEMPERATURA   | 0.7414              |                      |                                  |
|                                              | TRT           | 0.0296              |                      |                                  |
|                                              | TIEMPO        | 0.5622              |                      |                                  |
| <b>HPLC: digestión <i>in vitro</i></b>       | TRT           | <.0001              | 0.98                 | 15.16                            |
|                                              | TIEMPO        | <.0001              |                      |                                  |