



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

***“EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE SUBPRODUCTOS DE MANGO SOBRE  
LA DINÁMICA DE FERMENTACIÓN COLÓNICA EN UN REFRIGERIO  
POTENCIALMENTE SALUDABLE”***

POR:

ITB. BLANCA CAROLINA GARCÍA GARIBAY

TESIS PROPUESTA A LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

Director:

Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga

Co-directora:

Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi

Tepic, Nayarit, México

Diciembre, 2020

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

## RESUMEN

Blanca Carolina García Garibay. MCA: Instituto Tecnológico de Tepic. Diciembre 2020. Efecto de la sustitución de subproductos de mango sobre la dinámica de fermentación colónica en un refrigerio potencialmente saludable. Dr. Victor Manuel Zamora Gasga.

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la sustitución de subproductos de mango (SM) sobre la dinámica de fermentación colónica, capacidad antioxidante e inhibición enzimática de un refrigerio potencialmente saludable. Se preparó un refrigerio control (RC) a base de harina de trigo y avena. Los SM (pasta-cáscara-semilla) sustituyeron a la harina de trigo en distintas proporciones elaborando tres formulaciones: F1 (70-30-0), F2 (70-15-15), F3 (70-7.5-22.5). Los refrigerios se sometieron a una simulación del proceso de digestión gastrointestinal y se cuantificó y aisló la fracción indigestible (FI). Se realizó la simulación de la fermentación colónica *in vitro* utilizando la FI aislada en un sistema anaerobio durante los tiempos 6, 12, 24 y 48 h. Las muestras en cada tiempo fueron centrifugadas. En los extractos de fermentación (EF) se evaluaron los cambios de pH, el contenido de fenoles solubles totales (FST) y CAOX. Finalmente, se cuantificaron *Enterobacterias*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacillus* en el residuo de la fermentación. Además, en los EF se identificaron los metabolitos derivados de polifenoles por HPLC-DAD-MS y se calculó el % de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa. El contenido de FI total para las formulaciones con SM y el RC se encontró entre 20.38 y 32.27 g/100g. Durante la fermentación, un descenso de 0.56 y 0.5 unidades de pH ( $\Delta$  pH RC-F1) fue identificado a las 24 y 48 h respectivamente, para F1. Los valores de CAOX por DPPH para los refrigerios con SM (685-1931  $\mu$ M ET/L) fueron superiores al del RC (53-346  $\mu$ M ET/L) hasta las 24 h. En el contenido de FST se obtuvo un valor más alto en F2 (144.47  $\mu$ g EAG /mL) y F3 (147.32  $\mu$ g EAG /mL) comparado con F1 (113.79  $\mu$ g EAG /mL) a las 12 h ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, solo a las 48 horas de fermentación se observaron cambios significativos en el conteo de *Bifidobacterium*, donde la F1 mostró el conteo más bajo con  $3.72 \times 10^7$  UFC/g y la F3 el más alto con  $5.02 \times 10^8$  UFC/g, sin embargo, no hubo diferencias significativas con respecto a F2 ( $3.07 \times 10^8$  UFC/g) y RC ( $2.13 \times 10^8$  UFC/g). Se identificaron 22 compuestos por HPLC entre ellos se encuentran ácidos fenólicos, mangiferina, catequina, urolitina A y noratiriol. Por último, no se mostraron diferencias significativas con respecto a los valores del % de inhibición de  $\alpha$ -amilasa (88.14 y 99.71%) a las 48 horas de fermentación. En conclusión, la incorporación de SM proporcionó propiedades antioxidantes derivadas de los polifenoles y el metabolismo intestinal por la microbiota lo que hace que el refrigerio presente características funcionales potencialmente benéficas al consumidor.

**Palabras clave:** Subproductos de mango, polifenoles, microbiota intestinal, bioconversión, metabolitos intestinales.

## SUMMARY

Blanca Carolina García Garibay. MCA: Technological Institute of Tepic. December 2020. Effect of mango by-product substitution on colonic fermentation dynamics in a potentially healthy snack. Dr. Victor Manuel Zamora Gasga.

The objective of the work was to evaluate the effect of the substitution of mango by-products (MB) on the dynamics of colonic fermentation, antioxidant capacity (CAOX, DPPH and FRAP) and enzymatic inhibition of a potentially healthy snack. A control snack (CS) was prepared based on wheat flour and oats. The MB (pasta-peel-seed) substituted wheat flour in different proportions, elaborating three formulations: F1 (70-30-0), F2 (70-15-15), F3 (70-7.5-22.5). The snacks were subjected to a simulation of the gastrointestinal digestion process and the indigestible fraction was quantified and isolated. *In vitro* colonic fermentation simulation was performed using isolated IF in an anaerobic system during times 6, 12, 24 and 48 h. The samples at each time were centrifuged. In the fermentation extracts (FE) the changes in pH, the content of total soluble phenols (TSP) and CAOX were evaluated. Finally, *Enterobacteria Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Bacillus* were quantified in the fermentation residue. Furthermore, metabolites derived from polyphenols were identified in the FEs by HPLC-DAD-MS and the inhibition of the enzyme  $\alpha$ -amylase (%) was calculated. The total FI content for the formulations with MB and CS was found between 20.38 and 32.27 g / 100g. During fermentation, a decrease of 0.56 and 0.5 pH units ( $\Delta$  pH RC-F1) was identified at 24 and 48 h respectively, for F1. The CAOX values by DPPH for the snacks with MB (685-1931  $\mu$ M ET / L) were higher than the CR (53-346  $\mu$ M ET / L) up to 24 h. In the TSP content, a higher value was obtained in F2 (144.47  $\mu$ g GAE / mL) and F3 (147.32  $\mu$ g GAE / mL) compared to F1 (113.79  $\mu$ g GAE / mL) at 12 h ( $p < 0.05$ ). On the other hand, only after 48 hours of fermentation were significant changes observed in the Bifidobacterium count, where F1 showed the lowest count with  $3.72 \times 10^7$  CFU / g and F3 the highest with  $5.02 \times 10^8$  CFU / g. However, there were no significant differences with respect to F2 ( $3.07 \times 10^8$  CFU / g) and CS ( $2.13 \times 10^8$  CFU / g). Twenty two compounds were identified by HPLC among them are phenolic acids, mangiferin, catechin, urolithin A and noratiriol. Finally, no significant differences were shown with respect to the values of the% inhibition of  $\alpha$ -amylase (88.14 and 99.71%) at 48 hours of fermentation. In conclusion, the incorporation of MB provided antioxidant properties derived from polyphenols and intestinal metabolism by the microbiota, which makes the snack present potentially beneficial functional characteristics to the consumer.

**Key words:** Mango by-products, polyphenols, intestinal microbiota, bioconversion, intestinal metabolites.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	III
<b>SUMMARY</b>	IV
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Alimentos Funcionales.	3
2.1.1. Diseño de Alimentos Funcionales	4
2.2. Subproductos en la industria alimentaria	5
2.3. Subproductos de mango.	5
2.3.1. Compuestos de interés en subproductos de mango	6
2.4. Sistema digestivo.	9
2.4.1. Fracción Indigestible de los alimentos	11
2.4.2. Colón y Microbiota intestinal.	12
2.4.3. Alimentación cruzada de microorganismos.	14
2.4.4. Interacción enzimática con la microbiota colónica humana.	16
2.4.5. Fermentación colónica	16
2.5. Metabolitos derivados de la fermentación colónica de subproductos de mango	17
2.5.2. Actividad biológica de los ácidos grasos de cadena corta.	19
2.6. Metabolismo de polifenoles por la microbiota colónica.	20
2.7. Enfermedades crónicas no transmisibles	21
2.8. Dieta y salud del colón	22
<b>CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS</b>	24

<b>CAPÍTULO 5. OBJETIVOS</b>	25
5.1 Objetivo general	25
5.2. Objetivos específicos	25
<b>CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
6.1. Obtención de la muestra.	26
6.2. Preparación de las barras	26
6.3. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> : Aislamiento de fracción indigestible.	27
6.3.1 Cuantificación de la fracción indigestible total, soluble e insoluble	28
6.4. Fermentación colónica <i>in vitro</i>	29
6.5. Evaluación de capacidad antioxidante de los extractos de fermentación y pH.	30
6.5.1. Evaluación de poder antioxidante por el método de la capacidad de Reducción Férrica de Plasma (FRAP)	30
6.5.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracilo)	31
6.5.3. Fenoles Solubles Totales.	32
6.5.4. Evaluación de pH	33
6.6. Etapa 2: Identificación de cambios de la microbiota y Aislamiento de bacterias.	33
6.6.1. Identificación bioquímica ( <i>Lactobacillus</i> y microorganismos próximos)	34
6.6.1.1. Preparación de las galerías API 50CH	36
6.6.1.2. Preparación del inóculo.	36
6.6.1.3. Inoculación de las galerías API, lectura e interpretación de resultados.	37
6.6.2. Identificación bioquímica (Bacterias anaerobias)	38

Cuadro 6.4 Sustratos de pruebas bioquímicas incluidos en la galería enzimática para bacterias anaerobias API 20A.	39
6.6.2.1. Preparación de las galerías API 20 A	40
6.7.2.2. Preparación del inóculo	40
6.6.2.3. Inoculación de las galerías, lectura e interpretación de resultados.	40
6.6.3. Identificación bioquímica ( <i>Enterobacterias</i> )	41
6.6.4. Identificación de <i>Bacillus sp</i>	41
6.7. Perfil de metabolitos microbianos mediante cromatografía HPLC-DAD-MS	42
6.8. Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa.	44
6.9. Análisis Estadístico.	44
<b>CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	46
7.1. Composición proximal de los refrigerios y Fracción Indigestible	46
7.2. Cambios en el pH	48
7.3 Capacidad Antioxidante DPPH, FRAP y Fenoles Solubles Totales (FST)	50
7.4. Identificación y aislamiento de bacterias de la microbiota	54
7.5. Identificación del perfil de metabolitos microbianos mediante HPLC-DAD-MS.	59
7.6. Inhibición enzimática $\alpha$ -amilasa.	75
<b>CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES</b>	77
<b>CAPÍTULO 9. REFERENCIAS</b>	78

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1 Aplicación de Subproductos de mango	8
Cuadro 2.2 Bacterias predominantes en la microbiota humana.	13
Cuadro 2.3 Enzimas producidas por microorganismos presentes en el colon.	15
Cuadro 2.4 Producción de Metabolitos y sus beneficios	18
Cuadro 6.1 Formulación de refrigerios con subproductos de mango 'Ataulfo'	27
Cuadro 6.2 Sustratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH	35
Cuadro 6.3 Cuadro de identificación de perfil bioquímico pruebas API 20.	37
Cuadro 6.4 Sustratos de pruebas bioquímicas incluidos en la galería enzimática para bacterias anaerobias API 20A.	39
Cuadro 6.5 Estándares utilizados en HPLC y sus concentraciones en unidades de área	43
Cuadro 7.1 Composición proximal y fracción indigestible (FI) de los refrigerios elaborados con subproductos de mango y refrigerio control (g/100g).	47
Cuadro 7.2 Concentración ( $\mu\text{Mol}$ ) de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción indigestible asilada de refrigerios elaborados con subproductos de mango.	60
Cuadro 7.2 Concentración ( $\mu\text{Mol}$ ) de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción indigestible asilada de refrigerios elaborados con subproductos de mango.	69



Cuadro 7.4 Concentración ( $\mu\text{Mol}$ ) de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción indigestible asilada de refrigerios elaborados con subproductos de mango.

73

## LISTA DE FIGURAS





























Figura 2.1 Diagrama de criterios de diseño de un alimento funcional.	4
Figura 2.2 Comparación de componentes de fibra dietética y fracción indigestible	12
Figura 7.1 Cambios de pH durante la fermentación colónica de la fracción indigestible en control negativo ( $\diamond$ ), rafinosa ( $\blacktriangle$ ), refrigerio control ( $\bullet$ ), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, 70:30 ( $\square$ ); F2, 70:15:15 ( $\blacksquare$ ); F3, 70:7.5:22.5 ( $\circ$ ).	49
Figura 7.2 Concentración de Fenoles Solubles Totales en un refrigerio control (RC  ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (  ) , F2 (  ) , F3 (  )	51
Figura 7.3 Capacidad antioxidante DPPH de un refrigerio control (RC  ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (  ) , F2 (  ) , F3 (  )	52
Figura 7.4 Capacidad antioxidante FRAP de un refrigerio control (RC  ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (  ) , F2 (  ) , F3 (  ) .	54
Figura 7.5 Identificación de Enterobacterias en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC  ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (  ) , F2 (  ) , F3 (  ) .	55
Figura 7.6 Identificación de Bifidobacterias en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC  ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (  ) , F2 (  ) , F3 (  ) .	56
Figura 7.7. Identificación de Lactobacillus en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC  ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (  ) , F2 (  ) , F3 (  ) .	57

Figura 7.8 Identificación de *Bacillus* sp. en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 () , F2 () , F3 () .

58

Figura 7.9 Inhibición de enzima alfa amilasa en sobrenadantes a las 48h de fermentación colónica en refrigerios elaborados con subproductos de mango (F1, F2 y F3), refrigerio control (RC)

76

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Cada día las exigencias de los consumidores se dirigen más a la búsqueda de nuevos productos con propiedades funcionales que puedan proporcionar un valor nutritivo y otros componentes con actividad fisiológica (Berrio y cols., 2015), por lo que es necesario generar alimentos con propiedades funcionales en el mercado nacional que promuevan la salud del consumidor.

En la industria de procesamiento del mango, regularmente es utilizada la pulpa de los frutos, generando como desperdicios los subproductos, tales como cáscara, semillas y pasta, desaprovechando los compuestos bioactivos (Flores y cols., 2017) presentes en ellos (Sumaya-Martínez y cols., 2012). Los subproductos del mango representan aproximadamente del 35% al 60% de la fruta (Blancas-Benitez y cols., 2015). Martínez Morales (2016) menciona que los subproductos del mango tienen una gran actividad antioxidante atribuida a su alto contenido de compuestos bioactivos (CB), tales como compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles y esteroides. Por lo anterior, los subproductos del mango, ricos en CB, han sido estudiados como una alternativa natural más segura a los antioxidantes sintéticos en diferentes alimentos. Mercado-Mercado y cols. (2018) menciona que, en los subproductos de mango, también se pueden encontrar componentes como la fibra dietética. Ambos componentes (fibra dietética y CB) al entrar en contacto con el sistema digestivo del ser humano sufren cambios y transformaciones químicas, donde lo que no es digerido ni absorbido en el intestino delgado, puede ser disponible para ser utilizado como sustrato para la fermentación parcial o completa en el colon (Saura-Calixto y cols., 2000). Posteriormente, la fracción indigestible es biotransformada por la microbiota colónica, liberando metabolitos con propiedades beneficiosas para la salud; Del metabolismo de polifenoles se obtienen ácidos hidroxifenólicos principalmente, que ayudan en el mantenimiento de la salud gracias a su actividad antioxidante y brindan protección ante las enfermedades cardiovasculares y cancerígenas (O'keefe, 2016).

Por todo lo anterior, el presente trabajo pretende evaluar el efecto de la sustitución de subproductos de mango (*Mangifera, indica L.*) sobre la dinámica de fermentación colónica, capacidad antioxidante y propiedades hipoglucemiantes en un refrigerio potencialmente saludable.

## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Alimentos Funcionales.**

Durán y Valenzuela (2010) mencionan que el término alimentos funcionales surgió en Japón por primera vez en la década de los años 80's, cuando se iniciaron una serie de investigaciones, cuyo propósito fue conocer otras funciones de los alimentos, además de la principal función nutritiva. En general se define que los alimentos funcionales deben cumplir con tres funciones: la primera es "nutricional", esencial para la supervivencia del individuo. La segunda es una función "sensorial", esto es que su consumo produzca una sensación placentera a partir de su sabor, olor, textura, entre otras. La tercera es una función "fisiológica" con lo cual el alimento debe producir un efecto favorable en la nutrición, el biorritmo, el sistema nervioso, en la capacidad de defensa corporal, entre otras, de quien lo consume. Los alimentos funcionales, también pueden definirse como todos aquellos alimentos que además de aportar carbohidratos complejos, proteínas, lípidos y carbohidratos simple, aportan un beneficio a la salud a quien los consume (de la Cruz y cols., 2018).

En cambio, en Europa, de acuerdo con el Instituto de Fermentaciones (IFI), un alimento funcional es aquel que ha demostrado satisfactoriamente afectar benéficamente una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, en una forma relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad. Con respecto a México, no existe una definición oficial pero la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) propone un concepto similar al establecido por Europa (Flores y cols., 2017).

### 2.1.1. Diseño de Alimentos Funcionales

Un alimento funcional diseñado, es todo aquel que contenga ciertos compuestos en combinaciones o concentraciones específicas previamente establecidas, con la finalidad de ejercer un efecto en particular. En la Figura 2.1 se muestran algunos de los criterios de diseño de un alimento funcional. Los efectos benéficos se pueden lograr adicionándole un ingrediente o aumentando su concentración o biodisponibilidad, utilizando medios tecnológicos, o bien, sustituyendo los compuestos no deseados (Granato y cols., 2017).

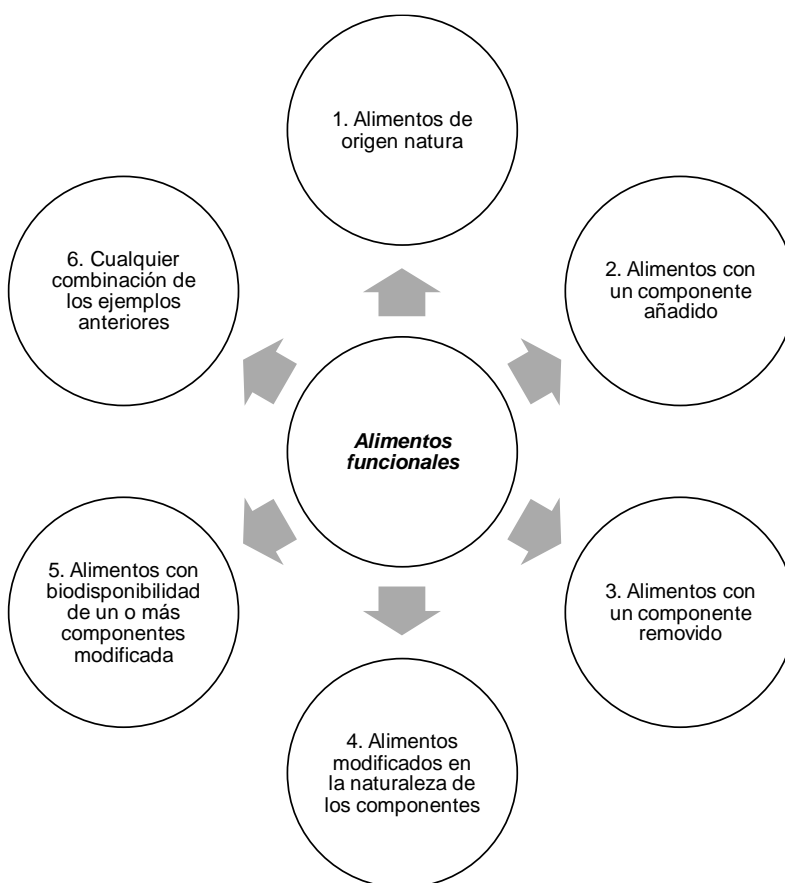


Figura 2.1 Diagrama de criterios de diseño de un alimento funcional.

## **2.2. Subproductos en la industria alimentaria**

Los hábitos de consumo y producción de alimentos actuales enfrentan una crisis de sostenibilidad, ante el crecimiento acelerado de la población y de la mano el incremento en la demanda por alimentos, uso intensivo de recursos y distribución insuficiente, con alto impacto ambiental y con grandes volúmenes de desperdicios a lo largo de todo el sistema de alimentos. Ante estos desafíos, es imperante transitar hacia un sistema alimentario sostenible (Jurgilevich y cols., 2016). Al hacer referencia a un sistema alimentario se entiende como la suma de los diversos elementos, actividades y actores, que mediante sus interrelaciones hacen posibles la producción, transformación, distribución y consumo del alimento (FAO, 2017). En la agroindustria, las materias primas son sometidas a procesos de adecuación o transformación para darles un valor agregado, mediante la implementación de algunas operaciones unitarias para facilitar su consumo; generando una alta producción de residuos. En algunos casos estos residuos son tratados hasta reducir el impacto negativo que su emisión, vertimiento o disposición pudiera generar; convirtiéndolos en un producto útil y de mayor valor agregado que solucione una problemática y genere ingresos económicos adicionales (Cury y cols., 2017).

## **2.3. Subproductos de mango.**

El mango (*Mangifera indica L.*) es una importante fruta tropical con aceptación mundial, cuenta con una gran producción y cuantiosos beneficios para la salud humana. A pesar de que cada parte del árbol del mango, hojas, flores y fruta contiene importantes nutrientes, la pulpa del fruto se ha distinguido por ser la preferida de los consumidores. Es así, que la industria de alimentos derivados del mango utiliza sólo las porciones comestibles de los frutos, y una cantidad considerable de pasta, cáscaras y las semillas se descartan como residuos industriales. Sin embargo, las partes del mango que son consideradas como



residuos, como la semilla y la cáscara, tienen un alto potencial funcional y nutricional (Torres-León y cols., 2016). Los subproductos de mango, especialmente la pasta, semillas y las cáscaras, se podrían considerar como fuentes baratas de alimentos valiosos e ingredientes nutraceuticos. Mirabella y cols. (2014) informaron que el 39% de los desechos de alimentos son producidos por las industrias manufactureras de alimentos en los países desarrollados, estos desechos representan un problema de contaminación ambiental. Una extensa investigación sobre los subproductos del mango ha revelado que los subproductos del mango, tales como las cáscaras, semillas y pasta, contienen altos niveles de varias sustancias que mejoran la salud, tales como los polifenoles, carotenoides, vitamina C y fibra dietética (Palafox, Yahia, y cols., 2012).

### **2.3.1. Compuestos de interés en subproductos de mango**

Se sabe que el fruto de mango contiene una gran cantidad de compuestos de interés funcional, tales como compuestos bioactivos (CB). Los CB pueden definirse como aquellos micro-constituyentes no nutrientes con actividad biológica significativa, también llamados fitoquímicos, que parecen desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la salud humana. Los principales grupos de estas sustancias son compuestos polifenólicos, carotenoides y fitoesteroles. (Saura-Calixto y Goni, 2009). En este sentido, Torres-León y cols. (2016) mencionan que la a semilla de mango es una fuente potencial de ingredientes alimenticios nutricionales, debido a la alta calidad de su grasa, proteína y al alto contenido de antioxidantes y de los compuestos que tienen una alta actividad antimicrobiana. Otros estudios han demostrado que los frutos de mango, incluyendo sus subproductos son considerados como una fuente de CB utilizados para ayudar al procesamiento y prevención de enfermedades, así como para proporcionar bienestar y salud; Su ingesta diaria en la dieta se ha relacionado con la prevención de las enfermedades degenerativas como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Okino Delgado y Fleuri, 2016). En el Cuadro 2.1 se

muestra algunas aplicaciones de los subproductos de mango en el desarrollo de alimentos potencialmente funcionales.

Los compuestos fenólicos contribuyen no sólo a las propiedades químicas y de textura en los alimentos, sino también a las propiedades sensoriales, principalmente a la astringencia y la amargura. Existen estudios en los cuales se ha informado que el contenido total de compuestos fenólicos en pulpa de mango es de 9.0 hasta 208 mg/100 g. Por otra parte, se estudiaron los compuestos bioactivos y el potencial antioxidante en cuatro extractos diferentes de mango (Baquero y cols., 2016) y se determinó que los principales polifenoles presentes en el fruto de mango son: manguiferina, catequinas, quercetina, kaempferol, antocianinas, ácidos gálico y elágico. Además, los flavonoles (quercetina, kaempferol, y ramnetina) están presentes principalmente como O-glucósidos, mientras que manguiferina es un C-Glicósido (Arrazola y cols., 2013)

Cuadro 2.1 Aplicación de Subproductos de mango

Subproducto	Aplicación	Conclusión	Referencia
Semilla de mango	Sustituto de aceite de cacao y estabilizante de producción de chocolate y medicamentos	Producción de ácido oleico de 45.6%, Grasas insaturadas de 53.7%, y grasas saturadas de 45.2%.	(Tapia Santos y cols., 2013)
Cáscara (Var. Kent)	Desarrollo de harina de cáscara de mango, con alto contenido de fibra insoluble	Mejora firmeza, color y contenido de fibra cruda, teniendo además aceptabilidad sensorial.	(Lopez Paz, 2018)
Pasta (Var. Ataulfo)	Muffin's adicionados con pasta de mango en forma de harina	Incrementa el contenido de polifenoles totales de 1.86 a 5.36%, y también la CAOX de 2.61 a 19.19 TE mmol/g bs	(Ramírez-Maganda y cols., 2015)
Pasta y Cáscara (Var. Ataulfo)	Snacks que sustituyen el azúcar refinada por subproductos de mango	Aumenta la cantidad de fibra dietética total de 5.46 a 13.39 g/100g, fibra dietética soluble de 4.89, fibra dietética insoluble a 7.75 g/100g. y CAOX de 697 µg Trolox/100 g	(Blancas-Benitez y cols., 2015)

## **2.4. Sistema digestivo.**

La digestión es un evento fisiológico complejo que ha evolucionado para garantizar la absorción más eficiente de los nutrientes de los alimentos. La digestión tiene lugar en el sistema digestivo (SD), que se puede considerar como un canal abierto que comprende la cavidad oral, esófago, estómago, intestino (compuesto de duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (colon ascendente, transverso, descendente, recto y ano). Una sección transversal del SD está compuesta por los siguientes tejidos: mucosa, submucosa, musculatura mucosa y serosa.

El epitelio es la capa más interna de la mucosa, donde tiene lugar la mayoría de los procesos secretivos, digestivos y de absorción. El epitelio siempre está cubierto por una capa delgada de moco que tiene funciones protectoras y mecánicas. Las glándulas secretoras están asociadas con el SD y el suministro de agua, las enzimas digestivas, las hormonas y otros componentes necesarios para los procesos digestivos (protones, sales biliares, etc.). La progresión oral del bolo alimenticio a través del SD es proporcionada por un movimiento ondulatorio altamente coordinado conocido como peristalsis que comprende la contracción de las mucosas musculares detrás del bolo y su relajación en la sección inmediatamente después del bolo. La contracción rítmica de pequeños segmentos del SD proporciona la mezcla de la digesta (Capuano, 2017). El procesamiento oral es el primer paso en la digestión de los alimentos; durante este procesamiento oral, los alimentos sólidos se descomponen mecánicamente en pequeñas partículas, mediante la masticación y la mordedura.

La trituración de alimentos permite la máxima extracción de nutrientes de los pasos de digestión subsiguientes. La mezcla con la saliva contribuye a convertir los materiales sólidos que no fluyen en un bolo alimenticio que se puede tragar y llevar al estómago mediante movimientos peristálticos de los músculos esofágicos. La saliva humana contiene amilasa salival y lipasa lingual que comienza la digestión del almidón y los lípidos en la boca, así como lisozima, lactoferrina y glucoproteínas de la mucosa (mucinas) (Humphrey y Williamson, 2001). En el estómago, la

desintegración de los alimentos continúa aún más por la acción simultánea del jugo gástrico ácido, la mezcla mecánica y la actividad enzimática de la pepsina (a enzima proteolítica) y lipasa gástrica. El pH del estómago varía de 1 a 3 en estado de ayuno, pero después de la ingesta de alimentos, puede aumentar a 5-7 dependiendo de la capacidad amortiguadora de la comida. Debido al bajo pH, la amilasa salival se desnaturaliza una vez que ingresa al ambiente gástrico, mientras que la hidrólisis lipídica puede continuar por la lipasa lingual resistente a los ácidos y la lipasa gástrica. Después del procesamiento gástrico, el tamaño de las partículas del alimento es del orden de magnitud de mm y el bolo ahora se conoce como quimo.

El quimo se vacía del estómago a una tasa variable dependiendo de la comida ingerida, pero generalmente se completa después de 150-180 minutos (N'Goma y cols., 2012). Los alimentos líquidos o poco viscosos se vacían más rápido que los alimentos sólidos. El intestino delgado es el sitio principal para la digestión de alimentos y la absorción de nutrientes. Gracias al jugo pancreático que contiene sales de bicarbonato, el pH del intestino aumenta a 5-7. El jugo pancreático contiene una variedad de enzimas para la digestión del almidón, proteínas y grasas. Las macromoléculas se hidrolizan en sus componentes monómeros, es decir, azúcares, aminoácidos y péptidos y ácidos grasos que se absorben de manera eficiente por una variedad de transportadores de borde de cepillo unidos a la membrana. Las proteínas y los péptidos se hidrolizan por tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa. El almidón se hidroliza por la  $\alpha$ -amilasa pancreática y los oligosacáridos resultantes se convierten además en  $\alpha$ -glucosidasa unida a la membrana en glucosa. La sacarasa unida a la membrana y la lactasa, la hidrolasa de la clorisisina para completar la hidrólisis de oligo y disacáridos en monosacáridos. Los lípidos se hidrolizan mediante lipasa pancreática (junto con co-lipasa en un complejo), colesterol esterasa y fosfolipasa A2.

Los ácidos grasos libres resultantes y los compuestos lipófilos (por ejemplo, vitamina A, D, carotenoides, etc.) son incorporados en micelas mixtas

estabilizadas por sales biliares (que actúan como surfactantes) y vesículas unilamelares y se absorben a través de pinocitosis por las células epiteliales. Otros nutrientes y moléculas son captados por transportadores específicos que pasan a través del epitelio intestinal por difusión pasiva.

El intestino delgado humano proporciona una superficie de absorción de aproximadamente 200 m<sup>2</sup> para la presencia de la plisada circular y las vellosidades, así como del borde en cepillo de las células epiteliales. La digestión de los alimentos se completa en el intestino grueso, donde la microbiota local fermenta lo que escapa a la absorción en el intestino grueso. Los ácidos grasos de cadena corta son productos típicos de la fermentación bacteriana en el colon. En el intestino grueso, puede ocurrir cierta absorción de nutrientes junto con la reabsorción de una cantidad sustancial de agua del quimo antes de que se expulsen las heces. Los procesos digestivos (secreción de enzimas y otros factores, motilidad intestinal) se rigen por una serie de vías neuro-hormonales complejas como la celulosa, lignina y  $\beta$ -glucanos, por mencionar algunas, las cuales están controladas por el perfil químico luminal y el volumen. El primero es detectado por las células entero-endocrinas quimiosensoras epiteliales especializadas (Sternini y cols., 2008), y este último por mecanorreceptores (células neurales activadas por estiramiento) que se producen dentro de la mucosa muscular (Furness, 2000).

#### **2.4.1. Fracción Indigestible de los alimentos**

La fracción indigestible (FI) es aquella parte de los “alimentos vegetales” que no se digiere ni se absorbe en el intestino delgado, llegando al colon, donde es un sustrato para la microbiota fermentativa (Saura-Calixto y cols., 2000). Como tal, comprende no sólo fibra dietética, sino también otros compuestos con resistencia a la acción de enzimas digestivas, como el almidón resistente, la proteína resistente, los compuestos fenólicos, los compuestos de Maillard y otros compuestos asociados (Saura-Calixto y cols., 2000) como lo son ceras, cutinas o

fitoesteroles (Gray, 2006). Estos compuestos además, pueden ser fermentados por la microbiota del colon, y presentar efectos fisiológicos similares a los de la fibra dietética (Saura-Calixto y cols., 2000). Por otro lado Saura-Calixto y Goñi (2004), mencionaron que el uso de la FI es más útil que la fibra dietética, porque los valores de FI son más cercanos a la cantidad de sustrato liberado en el colon, por lo que presenta valores más cercanos a las necesidades de la microbiota intestinal, además de que imita las condiciones fisiológicas y evita las modificaciones artificiales de la digestibilidad de los nutrientes y algunos errores asociados a la determinación analítica de la fibra. En la Figura 2.2, se observan los componentes que conforman la fibra dietética y la fracción indigestible, logrando realizar una comparativa entre ambos.

Fibra dietética	Fracción Indigestible
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carbohidratos</li> <li>• Polisacaridos</li> <li>• Almidón</li> <li>• Lignina</li> <li>• Hemicelulosa</li> <li>• Celulosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibra Dietética</li> <li>• Almidon Resistente</li> <li>• Proteína Resistente</li> <li>• Compuestos Bioactivos</li> </ul>

Figura 2.2 Comparación de componentes de fibra dietética y fracción indigestible

#### 2.4.2. Colón y Microbiota intestinal.

La microbiota, es una parte importante del cuerpo humano, la cual constituye entre el 40 y 45% de sólidos fecales en personas con dietas occidentales (Cabotaje y cols., 1990). El intestino grueso humano mide aproximadamente 150 cm de largo con un área de superficie de 1300 cm<sup>2</sup> (no seccionada). La microbiota colónica, son cientos de especies y aunque hay diferencias interindividuales significativas, ciertas especies bacterianas están presentes constantemente en la mayoría de los individuos (Sekelja y cols., 2011). La mayor parte de los componentes de la microbiota son bacterias con una pequeña cantidad de virus, hongos y células eucariotas. En el Cuadro 2.2. se muestran las bacterias más abundantes en el colon humano. Es conocido que los filos con mayor abundancia en humanos son los *Firmicutes*, que representan del 60-80% e incluyen más de 200 géneros, entre los cuales los más importantes son los *Ruminiococcus*, *Clostridium* y *Lactobacillus*, por otra parte los *Bacteroidetes* representan aproximadamente de un 20-30% en donde destacan los *Bacteroides*, *Prevotella* y *Xylanibacter*, en un 10% también se encuentran las *Actinobacterias* en las cuales predominan las del género *Bifidobacterium* y en menor medida se pueden localizar *Proteobacterias* tales como *Escherichia Coli* y *Enterobacteriaceae* (Muñoz-Garach y cols., 2016).

Cuadro 2.2 Bacterias predominantes en la microbiota humana.

<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Actinobacterias</i>	<i>Proteobacterias</i>
60-80%	20-30%	<10%	<1%
<i>Ruminiococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bifidubacterium</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Prevotella</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Xylanibacter</i>		

Fuente: Muñoz-Garach y cols. (2016)

Hay una gran interacción entre los microorganismos de la microbiota y el huésped, ya que está implicada en una gran variedad de funciones metabólicas tales como la fermentación, la absorción de hidratos de carbono sin digerir, la absorción de



electrolitos y minerales, la modulación de la motilidad intestinal y la síntesis de algunos micronutrientes. Debido a lo anterior, los cambios microbianos en el intestino humano se ha propuesto como una causa posible de obesidad (Ley y cols., 2005).

### **2.4.3. Alimentación cruzada de microorganismos.**

Algunas regiones del sistema gastrointestinal de los mamíferos (rumen o colon) albergan comunidades microbianas extremadamente densas, en las que la cantidad de bacterias presentes puede ser mayor de  $10^{11}$  por gramo de heces. En estos sitios ocurre la degradación de polisacáridos por las bacterias existentes. Los seres vivos herbívoros tienen una dieta basada en plantas, obteniendo los polisacáridos existentes en la pared celular de las mismas, lo cual no es digerible por las enzimas del huésped, destinando el 70% a la fermentación microbiana. El colon permite el tránsito lento de la digesta en condiciones anaerobias, permitiendo la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales pueden ser asimilados y utilizados por el huésped. Se considera que las bacterias colónicas están involucradas en una gran variedad de transformaciones metabólicas, por lo que la microbiota colónica tiene un papel muy importante en la salud de los seres vivos, por ejemplo, la producción de AGCC como el butirato, el cual se cree que contribuye a la prevención de cáncer colorectal en ratas y humanos. Tomando en consideración que la microbiota está directamente involucrada con una gran variedad de transformaciones metabólicas, se ha considerado que los humanos con obesidad difieren con las proporciones principales de filos bacterianos en su microbiota intestinal. La gran variedad de sustratos que llegan al colon, como lo pueden ser almidones, polisacáridos como xilanos y pectinas, oligosacáridos, etc, pueden crear una gran variedad de nichos ecológicos en el colon, los cuales son altamente aprovechados por las bacterias que lo habitan (Flint y cols., 2008).

La mayoría de las bacterias que habitan la microbiota intestinal, poseen enzimas capaces de degradar polisacáridos de la fracción indigestible, existiendo también

pocas bacterias que logran involucrarse en la descomposición de sustratos insolubles recalcitrantes. En el colon humano, la digestibilidad de la celulosa de la fibra dietética es mucho más alta que la de la celulosa cristalina purificada, y las bacterias celulolíticas que se han aislado del tracto gastrointestinal humano tienen menos actividad contra sustratos celulósicos más recalcitrantes. Las bacterias celulolíticas requieren la capacidad de degradar polisacáridos de la matriz, como los xilanos, mananos y pectinas, para acceder a las fibrillas de celulosa, aunque no necesariamente utilizan los productos solubilizados, que están disponibles para otros miembros de la comunidad a través de la alimentación cruzada. La alimentación cruzada, se define como aquella que sucede cuando el producto originado por un microorganismo después de alimentarse mediante un sustrato, funciona como sustrato para otro microorganismo presente en el medio, para así lograr crear un nuevo producto o metabolito (Pande y cols., 2014).

En la membrana celular de las bacterias de la microbiota, existen algunas enzimas que logran hidrolizar los polisacáridos insolubles hasta su monómero más simple, por ejemplo, la bacteria *Bacillus subtilis* puede generar  $\alpha$ -amilasa extra celular, la cual logra hidrolizar el almidón presente en la fracción indigestible (Flint y cols., 2008). En el cuadro 2.3. se observan algunas enzimas producidas por diferentes géneros bacterianos.

Cuadro 2.3 Enzimas producidas por microorganismos presentes en el colon.

Microorganismo	Enzima
<i>Bacillus subtilis</i>	$\alpha$ -amilasa
<i>Aspergillus oryzae</i>	Lipasa
<i>Bacillus licheniformis</i>	$\alpha$ -amilasa

Fuente: Olempska-Beer y cols. (2006).

#### **2.4.4. Interacción enzimática con la microbiota colónica humana.**

Existen algunos componentes de la dieta que no logran ser hidrolizados durante la digestión gastrointestinal, los cuales logran llegar al colon. Dentro del colon, habitan algunos microorganismos mejor conocidos como microbiota colónica que producen algunas enzimas, las cuales pueden hidrolizar los componentes indigestibles (Caponi, 2018). Diversos estudios, han sugerido que el mantener una correcta simbiosis microbiana logra mantener una actividad enzimática moderada, logrando con esto la prevención de cáncer colorrectal y enfermedades inflamatorias en el colon y asegurar una correcta absorción de polifenoles (Álvarez-García, 2020).

#### **2.4.5. Fermentación colónica**

En el humano, el intestino grueso recibe el material del íleon que ya ha sido digerido, los contenidos se mezclan y son retenidos durante 6-12 h en el ciego y en el colon ascendente. A partir de entonces, la digesta se expulsa y se pasa a través del colon transversal para su almacenamiento y alcanza el colon descendente y su eventual eliminación. El tiempo promedio de retención del material que entra al colon hasta su excreción es de aproximadamente 60 h en individuos del Reino Unido (Cummings y Macfarlane, 1991). La cantidad total de material que entra en el colon cada día es de 1.5 kg aproximadamente, mientras que el peso promedio de las heces, es de 120 g/d (Cummings y Macfarlane, 1991). Por lo tanto, el intestino grueso es un sistema abierto, con nutrientes que fluyen desde el ciego, bacterias, productos metabólicos de éstas y la fracción no utilizada en esta sección termina siendo excretada en forma de heces. La hidrólisis anaeróbica de los carbohidratos y proteínas por bacterias se conoce convencionalmente como fermentación colónica. En el hombre, los productos finales principales son los AGCC, ácido acético, propiónico y butírico, los gases de

H<sub>2</sub>, y CO<sub>2</sub>, amoníaco, aminas, fenoles y energía, que las bacterias utilizan para el crecimiento y el mantenimiento de la función celular (Scott y cols., 2013).

## **2.5. Metabolitos derivados de la fermentación colónica de subproductos de mango**

Sáyago-Ayerdi y cols. (2019) lograron encontrar metabolitos de la fermentación colónica en subproductos de mango (cáscara) en donde los más abundantes fueron el ácido acético, propiónico y butírico, que comprende el 95% de los AGCC total, mientras que otros ácidos como el ácido valérico, cáprico, succínico, láctico y fórmico se forman como metabolitos intermedios. La concentración de metabolitos producida en el colon puede alcanzar los 150 mM. Por otro lado, Barnes y cols. (2016) mencionan haber detectado múltiples metabolitos de mango variedad 'Keitt' derivados del ácido gálico después de realizar una hidrólisis fisiológica *in vitro*. El mango es rico en galotaninos de diferentes grados de polimerización, ácido gálico y glucósidos; se ha reportado que el consumo de 400 g de mango diario, ocasiona un aumento significativo en la presencia de ácido gálico y metabolitos de pirogalol (Barnes y cols., 2018). Algunos de los metabolitos que se han encontrado a partir del consumo de mango se enlistan en el Cuadro 2.4.

Cuadro 2.4 Producción de Metabolitos y sus beneficios

Microrganismos Presentes	Metabolitos	Implicaciones en la salud	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Péptidos de formilo	Auxiliar en la disminución de inflamación infecciosa, enfermedades autoinmunes, trastornos neurodegenerativos y cáncer.	Rooks y Garrett (2016)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HBP	Controladores de infecciones y contribuyen a la respuesta inmune del huésped.	Rooks y Garrett (2016)
<i>Bacteroides fragilis</i>	PSA	Inmunomodulador útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes humanas.	Rooks y Garrett (2016)
<i>Ruminococcus</i>	Ácido acético	Estimulación de síntesis de colesterol y ácidos grasos de cadena larga	Frost y cols., 2014
<i>Microorganismos anaerobios</i>	Ácido propiónico	Reducción de lipogénesis, inducción de glucogénesis y liberación de hormonas de saciedad.	Kimura y cols., 2011
<i>Microorganismos anaerobios</i>	Ácido Butírico	Fuente de energía por células epiteliales, apoptosis celular por lo cual brinda prevención de cáncer de próstata y colitis	Fung y cols., 2012; Flint y cols., 2015

<i>Clostridium</i>	Ácido Desoxicólico	Desarrollo de obesidad y cáncer en ratones	Yoshimoto y cols., 2013
--------------------	-----------------------	---	-------------------------------

---

### 2.5.2. Actividad biológica de los ácidos grasos de cadena corta.

Durante la fermentación colónica ocurren un gran número de complejas interacciones derivadas de la alimentación cruzada entre los microorganismos del colon. La presencia de carbohidratos indigestibles y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) pueden alterar positivamente la fisiología del colon. En la actualidad, existe un gran número de estudios sobre la microbiota intestinal han mostrado que la producción de AGCC ocurre en el orden siguiente: acético > propiónico > butírico, en proporciones molares de aproximadamente 60:20:20, principalmente fermentados en el colon proximal y distal. En donde el butirato es la principal fuente de energía para los colonocitos, el propionato es en gran parte absorbido por el hígado y el acetato entra en la circulación periférica para ser metabolizada por los tejidos periféricos (Wong y cols., 2006).

La producción de AGCC se ve afectada por muchos factores, incluyendo la fuente de sustrato, en particular, la composición química del sustrato fermentable, la cantidad de sustrato disponible, su forma física (por ejemplo, tamaño de partícula, la solubilidad, la asociación con complejos indigeribles tales como lignina), la composición de las especies de bacterias de la microbiota, factores ecológicos (interacciones competitivas y de cooperación entre los diferentes grupos de bacterias) y el tiempo de tránsito intestinal (Huazano-García y López, 2013). Asimismo, se menciona que un AGCC puede ser un auxiliar en la reducción del desarrollo de trastornos intestinales, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Wong y cols., 2006).

Topping y Lockett (2016) mencionan que los AGCC son compuestos pleiotrópicos notables que proporcionan la fuente de energía preferida para las células de la mucosa que recubren el intestino y para los canales encargados de la recolección de energía adicional de los componentes del alimento no digeridos en el intestino delgado. Se ha demostrado que promueven la homeostasis intestinal (incluyendo la eliminación de células cancerosas y precancerosas a través de apoptosis), mantienen la función de barrera intestinal, promueven el desarrollo del sistema inmune intestinal, suprimen la inflamación intestinal, ayudan en el desarrollo de la tolerancia inmune y promueven la saciedad.

## **2.6. Metabolismo de polifenoles por la microbiota colónica.**

Los polifenoles que no logran ser digeridos en el tracto gastrointestinal, logran mantenerse asociados a la fibra dietética (FD) llegando de esta manera al colon, en donde podrán ser liberados por los microorganismos presentes mediante una hidrólisis parcial o completa de la FD (Topping y Lockett, 2016). Diversos autores han demostrado que los polifenoles que podrían estar presentes en la dieta, tienen una relación directa con la modulación y función de la microbiota colónica, además de que podrían ejercer propiedades antiinflamatorias (Kumar Singh y cols., 2019). El metabolismo de los polifenoles por la microbiota colónica se relaciona con la ruptura de los enlaces glucosídicos y de la estructura heterocíclica, por lo que aquellos polifenoles provenientes de las frutas pueden ser utilizados por la microbiota para ser hidrolizados y generar metabolitos bacterianos de bajo peso molecular, los cuales pueden ser absorbidos para posteriormente dirigirse al hígado del consumidor y llegar al torrente sanguíneo mediante la vena porta, para ser esparcidos al área del cuerpo humano en donde pueda ejercer ese efecto benéfico (Cardona y cols., 2013).

## **2.7. Enfermedades crónicas no transmisibles**

La relación de enfermedad y mortalidad encausadas a enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), entre las que se incluyen a las respiratorias, diabetes, cardiovasculares y cáncer, se ha visto un incremento en los últimos años. Por lo que se ha estimado que durante el 2008 el 62% de los descensos y aproximadamente el 50% de las enfermedades diagnosticadas a nivel mundial fueron a causa de ECNT. Por otra parte, algunos estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han señalado que para el año 2020 el 75% de las muertes a nivel mundial serán causadas a dichas enfermedades (Ferrante y cols., 2011). Por otro lado Córdova-Villalobos y cols. (2008) mencionan que las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son uno de los mayores retos que enfrenta la población mexicana, y son catalogadas así por varios factores, como lo son el gran número de casos afectados, su creciente contribución a la mortalidad general, la conformación en la causa más frecuente de incapacidad prematura y la complejidad y costo elevado de su tratamiento.

González-Camaño y cols. (2014) realizaron una comparación de las principales causas de mortalidad en México durante los años 1970 y 1980, en donde comprobaron que los accidentes desplazan a la influenza y neumonía en primer lugar, mientras que las enfermedades cardiovasculares sustituyen a la enteritis y otras enfermedades diarreicas del segundo lugar, así como también destacan el aumento de cáncer y la aparición de la diabetes mellitus dentro de las 10 primeras causas de mortalidad. Los datos existentes en la actualidad indican que prevalecen 4 tipos de ECNT, entre las cuales se encuentran la diabetes mellitus, cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias crónicas. Estas enfermedades son prevenibles en gran medida mediante una eficaz intervención temprana que aborden los factores de riesgo comunes, como el consumo de tabaco, dieta malsana, sedentarismo y uso nocivo de alcohol. Además, las mejoras del tratamiento de esas enfermedades pueden reducir la morbilidad, la



discapacidad y la mortalidad, y contribuir a mejorar los resultados sanitarios (Rabelo Padua y Díaz Piñera, 2012).

## **2.8. Dieta y salud del colón**

Una dieta rica en frutas y hortalizas está directamente asociada con beneficios a la salud incluyendo el mantenimiento a la salud fisiológica, cardiovascular, diabetes mellitus de tipo 2, Alzheimer, cáncer y otras. El mango contiene algunos fitoquímicos solubles en grasa como los carotenoides y otros solubles en agua tales como los polifenoles, ambos cuentan con distintos conductores de absorción y metabolismo. Generalmente los polifenoles son absorbidos en el cuerpo en su forma aglicona, con excepción de algunas antocianinas. Su metabolismo ocurre a través del tracto gastrointestinal por la acción de las enzimas salivales y la microbiota. Por otro lado la modificación estructural de los polifenoles (deglicosilación e hidrólisis) ocurre en el estómago y en el intestino largo mediante los efectos del pH, conjuntamente con la acción de las enzimas residentes (Burton-Freeman y cols., 2012).

Muñoz-Garach y cols. (2016) mediante un estudio mencionan que la obesidad y los metabolitos producidos en el colon tienen una relación directa, ya que los microorganismos que habitan en la microbiota colónica están relacionadas con la alimentación del huésped, lo que puede causar un proceso de inflamación y posteriormente obesidad. Por lo que se considera que consumir alimentos “sanos” puede generar un efecto antiinflamatorio, así como hipoglucemiante ya que estas mismas bacterias ayudan a mejorar la salud del consumidor.

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la población se encuentra en riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles, principalmente relacionadas con el sistema digestivo, por lo que es de gran importancia comenzar a agregar a la dieta del consumidor, aperitivos realizados con frutas y vegetales, los cuales pueden saciar las exigencias sensoriales y nutricionales de quien los consuma. Por otro lado, en el mercado existe gran variedad de productos realizados a partir de la pulpa de mango; sin embargo, los subproductos de mango (*Mangifera Indica L*) tal como la cáscara, la semilla o la pasta, son considerados desperdicios, pero presentan una fuente de compuestos bioactivos y fibra dietética que podrían convertirlos en ingredientes potencialmente funcionales. Los compuestos bioactivos de los subproductos de mango y su metabolismo en el sistema gastrointestinal han demostrado evidencia de reducir los síntomas de algunas enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión, cáncer, entre otras. Sin embargo, aún falta generar información de los efectos de los metabolitos productos de la fermentación colónica de los alimentos. Actualmente, no existen estudios que den a conocer los metabolitos producidos durante la fermentación colónica de refrigerios hechos con subproductos de mango. Tampoco se ha establecido un mecanismo sobre el que se definan los cambios en la composición de la microbiota o las interacciones que puedan existir en un sistema tan complejo que involucra diferentes reacciones químicas y enzimáticas.

Debido a todo lo anterior es necesario evaluar el efecto de la sustitución de subproductos de mango (*Mangifera, indica L.*) sobre la dinámica de fermentación colónica, capacidad antioxidante e inhibición enzimática en los extractos de fermentación de un refrigerio potencialmente saludable.

## CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

Los subproductos de mango (*Mangifera, Indica L*), mejoran la dinámica de fermentación colónica (pH, y composición de bacterias), capacidad antioxidante (DPPH, FRAP, FST y Perfil de polifenoles) y propiedades inhibidoras de enzimas (Inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa) mediante los metabolitos producidos durante la fermentación colónica de los componentes indigestible en un refrigerio potencialmente saludable

## CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la sustitución de subproductos de mango (*Mangifera, indica L.*) sobre la dinámica de fermentación colónica, capacidad antioxidante y propiedades de inhibición enzimática en un refrigerio potencialmente saludable.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar los cambios de pH, capacidad antioxidante (DPPH y FRAP), y contenido de fenoles solubles totales en los extractos de fermentación colónica de la fracción indigestible de un refrigerio potencialmente saludable.
- Identificar el crecimiento de bacterias y perfil de metabolitos en los extractos del refrigerio potencialmente saludable.
- Analizar las propiedades inhibidoras de enzimas mediante la inhibición de la actividad  $\alpha$ -amilasa en los extractos de fermentación colónica *in vitro* del refrigerio elaborado con subproductos de mango potencialmente saludable.

## **CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Obtención de la muestra.**

Las frutas de mango 'Ataulfo' fueron proporcionadas por un productor de San Blas Nayarit, México (21 ° 32'23 " Norte; 105 ° 17'08 " Oeste, con una temperatura promedio de 25 °C y una humedad promedio del 73%) las cuales se cosecharon en estado de madurez de consumo (11-14 °Brix), considerando el color amarillo, la longitud (12-15 cm) y el peso (180-280 g). Las frutas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio a 200 ppm antes del procesamiento. Los subproductos (pulpa, cáscara y semilla) se obtuvieron de la siguiente manera: la pulpa se separó de la semilla y la cáscara manualmente y, posteriormente, se utilizó un extractor convencional para obtener jugo y pasta de mango (subproducto). Los subproductos (cáscara, semilla y pasta) se deshidrataron a 60 °C entre 12 y 72 h en un horno de convección y aire forzado (Cabelas TS160D). Los productos deshidratados se homogeneizaron en un procesador de alimentos (NB-101B, Nutribullet, China) hasta alcanzar un tamaño de partícula de 500 micrómetros y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

### **6.2. Preparación de las barras**

Los ingredientes para las barras de granola fueron comprados en un supermercado local, en Tepic, estado de Nayarit, México. La formulación básica del refrigerio consistió en: harina de trigo, 50 g / 100 g (Tres Estrellas®, Toluca, Estado de México, México); hojuelas de avena, 10 g / 100 g (Grupo Industrial Vida, Zapopan, Jalisco, México), leche desnatada en polvo, 5 g / 100 g (Carnation®, Nestlé, México), jarabe de maíz, 35 g / 100 g (Karo®, ACH-FOOD, Ciudad de México). De acuerdo con un diseño unifactorial (Cuadro 6.1), se elaboraron cuatro formulaciones con diferentes proporciones de pasta, cáscara y harina de semilla,

reemplazando el peso equivalente al de la harina de trigo en la formulación básica. Control, refrigerio de trigo (100%); Refrigerio saludable (pasta-cáscara-semilla); F1 (70-30-0), F2 (70-15-15), F3 (70-7.5-22.5). Para la preparación de aperitivos, los ingredientes secos se mezclaron usando una licuadora. El jarabe de maíz, 10 mL de agua y 200 mg de grenetina se añadieron a la mezcla sólida y se homogeneizaron hasta obtener una mezcla uniforme, que luego fue laminada manualmente, se reposaron durante 8 horas y luego fueron cortadas (4 x 2 cm, aproximadamente 10 gramos), se empacaron en bolsas recubiertas de aluminio y se mantuvieron a 20°C para su análisis.

Cuadro 6.1 Formulación de refrigerios con subproductos de mango ‘Ataulfo’

Ingredientes (g/100g)	Control	F1	F2	F3
Cáscara	0	15	7.5	3.75
Semilla	0	0	7.5	11.25
Pasta	0	35	35	35
Avena	10	10	10	10
Leche desnatada	5	5	5	5
Jarabe de maíz	35	35	35	35
Grenetina	0.2	0.2	0.2	0.2
Harina de Trigo	50	0	0	0

### 6.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*: Aislamiento de fracción indigestible.

El modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* es una serie de seis pasos que se describen en el modelo: 1) Las muestras crudas fueron sometidas a digestión oral con  $\alpha$ -amilasa de saliva humana (pH 6.9, 37 °C, 2 min, A0521, Sigma-Aldrich). 2) Después, las muestras se incubaron en un baño de agua con agitación con

pepsina (300 mg / ml, pH 1.5, 40 °C, 2 h, P-7000, Sigma-Aldrich) para simular la digestión gástrica. 3) Luego, pancreatina (5 mg / ml, pH 7.5, 37 °C, 6 h, P-1750, Sigma-Aldrich) y  $\alpha$ -amilasa (120 mg, 37 °C, pH 7.9, 16 h, A-6255, Sigma-Aldrich) fueron añadidos. 4) El alimento digerido fue sometido a un proceso de diálisis (D9652, 12-14 KDa, Sigma Aldrich) durante 48 h para simular la absorción pasiva. Lo retenido en las muestras es considerado como fracción indigestible total del alimento (FIT). La FIT fue congelada y liofilizada para su posterior análisis.

### **6.3.1 Cuantificación de la fracción indigestible total, soluble e insoluble**

Para la determinación de la fracción indigestible en las muestras se utilizó la metodología propuesta por Saura-Calixto y cols. (2000). El método emula la digestión de los alimentos en el tracto gastrointestinal. Se pesaron 300 mg de muestra en base seca, en tubos de centrifuga, se adiciono 10 mL de regulador HCl-KCL (pH 1.5). Se ajustó el pH de los tubos a 1.5 y se adicionaron 0.2 mL de una solución de pepsina (P-7000, Sigma Aldrich, St Louis Missouri, USA) y buffer HCL-KCL 0.2 M (300 mg/mL). La mezcla se incubó a 40 °C por 1 h con agitación constante (80 rpm). Digestión intestinal: Se agregaron 4.5 mL de regulador fosfato 0.1 M y se ajustó el pH de cada tubo a 7.5. Se adicionó 1 mL de solución de pancreatina (P-1750, Sigma Aldrich) y buffer de fosfato 0.1 M (5 mg/mL), 1 mL de una solución de lipasa (A-3126, Sigma Aldrich) y buffer de fosfato 0.1 M (7 mg/mL), cada tubo se incubó a 37 °C por 6 h con agitación constante (80 rpm). Posteriormente, para la hidrólisis del almidón, se agregaron 9 mL del regulador tris maleato 0.1 M y se verificó el pH 6.9 para adicionar 1 mL de solución  $\alpha$ -amilasa (A-3176, Sigma Aldrich) y buffer tris maleato (120 mg/mL) y se incubó a 37 °C por 16 h con agitación constante (80 rpm). Terminado este tiempo se adicionaron 10 mL de regulador de acetato de sodio y se ajustó el pH a 4.75. A esta mezcla se le adicionó amiloglucosidasa (A-9913, Sigma Aldrich) y se incubaron a 60 °C por 45 min. Concluidas las reacciones enzimáticas, se procedió a centrifugar las muestras por 15 min a 3000 rpm, recuperando los sobrenadantes. Por otro lado, los residuos

fueron lavados con 5 mL de agua destilada y nuevamente fueron centrifugados, recolectando los sobrenadantes en vasos de precipitado de 100 mL. Los tubos con los residuos fueron colocados en una estufa durante 16 h a 105 °C para cuantificar gravimétricamente la FI insoluble de las muestras. El sobrenadante se colocó en membranas de diálisis (D9652-100ft avg. Ancho de 33 mm, 12400 Da, Sigma Aldrich) previamente tratadas y lavadas con agua hirviendo durante 5 min. (Aproximadamente 20 cm de cada bolsa de diálisis) y se dializó en agua corriente durante 48 h a temperatura de 25 °C para eliminar los componentes digeridos. Enseguida se transfirió el contenido de la bolsa de diálisis a un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó con agua destilada. Se tomaron 17 mL del volumen anterior y se colocó en tubos de ensaye, al que se le adicionó 1 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los tubos se llevaron a un baño de agua en ebullición durante 90 min. Terminada la hidrólisis ácida, se colocaron 2 mL de la solución anterior (muestra tratada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a tubos de ensaye que contenían 1 mL de reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico) y 0.5 mL de solución NaOH 3.9 M. Los tubos fueron mezclados en vortex. Posteriormente se preparó una curva de glucosa como estándar (0 a 2 mg/mL). Finalmente, la muestra se calentó 15 min en un baño de agua a ebullición, y posterior a esto, se adicionaron 15 mL de agua destilada, para cuantificar la FI soluble, como azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico en un espectrofotómetro (Jenway, 6715, USA) a 530 nm.

La FI total se determinó como la suma de la FI insoluble más la FI soluble.

#### **6.4. Fermentación colónica *in vitro***

Se utilizaron heces de cinco sujetos sanos, que no hayan tenido alguna infección gastrointestinal y que no hayan ingerido antibióticos durante los últimos tres meses antes de la donación. El proceso de fermentación *in vitro* se evaluó por triplicado para cada muestra (Campos-Vega y cols., 2009). En tubos estériles se colocó medio de cultivo basal constituido por agua peptonada, extracto de levadura, sales



NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, clorhidrato de L-cisteína, sales biliares, tween 80, vitamina K y hematina. Los tubos sellados se mantuvieron bajo condiciones anaerobias por 24 h. El inóculo fecal se homogenizó en buffer de fosfato de sodio 0.1 M. Los tubos que contenían el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de inóculo fecal y con 100 mg de fracción indigestible aislada de las muestras. La rafinosa fue utilizada como un control positivo. También se utilizó un blanco negativo, el cual contenía medio de cultivo y el inóculo fecal. La fermentación de ambos controles fue bajo las mismas condiciones de las muestras. Durante la fermentación, el pH, la capacidad antioxidante, la composición de la microbiota y la producción de metabolitos en los extractos fueron evaluados al tiempo 6, 12, 24 y 48 h. Los extractos de la fermentación de T<sub>0</sub> al T<sub>48</sub> fueron colectados y congelados a -80 °C para ser analizados.

## **6.5. Evaluación de capacidad antioxidante de los extractos de fermentación y pH.**

La capacidad antioxidante se evaluó en los extractos de fermentación colónica de la fracción indigestible a los tiempos 6, 12, 24 y 48 horas por los métodos de FRAP (Benzie y Strain, 1996) y DPPH (Prior y cols., 2005) y se identificaron los cambios en el pH durante los mismos tiempos

### **6.5.1. Evaluación de poder antioxidante por el método de la capacidad de Reducción Férrica de Plasma (FRAP)**

Se realizó la curva estándar bajo la metodología de diluciones seriadas de estándar (Trolox 5 mM) y para ello se necesitaron 5 tubos de ensaye (0.13, 0.065, 0.0325, 0.0162, 0.0081 mM/mL) y un blanco. En el primer tubo de ensaye se colocaron 52 µL de Trolox y se agregaron 1948 µL de medio de cultivo basal

constituido por agua peptonada, extracto de levadura, sales NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, clorhidrato de L-cisteína, sales biliares, tween 80, vitamina K y hematina para tener una concentración inicial de 0.13 mM (tubo 1), se agitó en vortex para homogenizar bien la solución. A los 4 tubos restantes se les añadió 1 mL de medio de cultivo basal y se tomó 1 mL del tubo anterior para agregarlo a cada tubo consecutivamente (1 mL del tubo 1 fue añadido al tubo 2, así sucesivamente). De cada tubo de la curva estándar y de la muestra, se depositaron 24 µL en cada pocillo de la microplaca por triplicado. La solución de trabajo FRAP se colocó en el dispensador, la cual contaba con una temperatura de 37°C en el recipiente exclusivo para el lector de microplaca. La lectura de muestras y de curva estándar se midieron en el lector de microplaca BioTek® (Synergy HT, Estados Unidos) a una longitud de onda de 595 nm a una temperatura de 37 °C.

#### **6.5.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracilo)**

Se utilizó el método propuesto por Prior y cols., (2005) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH• para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. Se prepararon 2000 µL de la dilución del radical DPPH disueltos con metanol (190 µM) y se colocaron en el dispensador del equipo. Se colocaron 30 µl de muestra en cada pocillo de la microplaca. Se cuantificó la capacidad antioxidante en el lector de microplaca (BioTek, Synergy

HT, Winooski VT, EE.UU.) con el software Gen5 a 517 nm durante 10 min. Se utilizó una curva patrón de trolox y los resultados se expresaron en mmol de equivalentes trolox/100g de muestra seca.

Se realizó la curva estándar bajo la metodología de diluciones seriadas de estándar (Trolox, 5 mM) y para ello se necesitaron 5 tubos de ensaye (600, 300, 150, 75, 37.5  $\mu$ M/L) y un blanco. En el primer tubo de ensaye se colocaron 240  $\mu$ L de Trolox y se agregaron 1760  $\mu$ L de medio de cultivo basal constituido por agua peptonada, extracto de levadura, sales NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_{4.7}H_2O$ ,  $CaCl_{2.2}H_2O$ ,  $NaHCO_3$ , clorhidrato de L-cisteína, sales biliares, tween 80, vitamina K y hematina para tener una concentración inicial de 600  $\mu$ M (tubo 1), el tubo se agitó en vortex para homogenizar bien la solución. A los 4 tubos restantes se les añadió 1 mL de medio de cultivo basal y se tomó 1 mL del tubo anterior para agregarlo a cada tubo consecutivamente (1 mL del tubo 1 fue añadido al tubo 2, así sucesivamente).

### **6.5.3. Fenoles Solubles Totales.**

Los fenoles solubles totales se determinaron con el reactivo Folin-Ciocalteu (Montreau 1972) usando un lector de microplacas de 96 pocillos (Biotek, Synergy HT, Winooski VT, EE. UU.) Con el software Gen5, y los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (mg GAE /mL de sobrenadante de la fermentación colónica). Se utilizaron 250  $\mu$ L de extracto y fueron mezclados con 1000  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio (75 g/L), y 1250  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu (100 mL/L) en tubos de ensayo. Los tubos fueron homogenizados utilizando un agitador vortex. La solución fue incubada a 50 °C en completa obscuridad durante 15 min. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron 270  $\mu$ L de esta mezcla en pocillos de microplacas. La absorbancia fue medida a 750 nm.

#### **6.5.4. Evaluación de pH**

Para llevar a cabo la evaluación de pH, se realizó de acuerdo a la NMX-F-317-S-1978, en donde primeramente se debe calibrar el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, pH 7 y pH 10 según la acidez de los extractos de fermentación. Se tomó una porción de la muestra ya preparada, se homogenizó bien por medio de un agitador y se ajustó su temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente el electrodo fue sumergido en los extractos de manera que los cubriera perfectamente. Se realizó la medición del pH. Se retiró el electrodo y fue lavado con agua destilada.

#### **6.6. Etapa 2: Identificación de cambios de la microbiota y aislamiento de bacterias en la fracción fermentada de barras de mango**

De los residuos obtenidos de la centrifugación de los extractos en cada tiempo de fermentación se cuantificaron y aislaron algunos géneros bacterianos.

Las muestras de los residuos de fermentación colónica fueron liofilizadas y posteriormente re-suspendidas en 3 mL de solución de fosfatos a un pH 7.4, se homogenizaron y se transfirió 1mL a un tubo con 1 mL de solución salina estéril (0.85% de NaCL) + cisteína (1%) para posteriormente realizar el aislamiento de bacterias anaerobias. Se realizaron diluciones decimales según la NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico, hasta la dilución  $10^{-6}$ . De cada dilución se inoculó 0.25  $\mu\text{L}$  en la superficie del medio, en placas que contenían agar LSB, agar Columbia para bacterias anaerobias, y agar MYP para Bacillus y, agar McConkey, XLD, Cetrimida para enterobacterias. Cada dilución se realizó por duplicado. La incubación se realizó a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24-48 horas, en aerobiosis y anaerobiosis de acuerdo con el microorganismo. Después de la incubación se escogieron las diluciones que contenían de 30 - 300 colonias para su cuantificación. Se observó

morfología colonial y tinción de Gram, las colonias o cepas de interés se conservaron en agar soya tripticaseína (AST), hasta su identificación.

#### **6.6.1. Identificación bioquímica de *Lactobacillus* y microorganismos próximos**

Para la identificación bioquímica se utilizaron el Kit API 50 CH y API 50 CHL. El API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos en los microorganismos. El API 50 CH se utiliza en combinación con el API 50 CHL Medium para la identificación de *Lactobacillus* y microorganismos próximos. Durante el período de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis, revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer tubo, sin principio activo sirve como testigo negativo. En el Cuadro 6.2, se muestran los sustratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH. En la práctica, solo se usan las abreviaturas en mayúsculas de los respectivos hidratos de carbono.

Cuadro 6.2 Sustratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH

Tira 0-9	Tira 10-19	Tira 20-29	Tira30-39	Tira 40-49
Pocillo/substrato				
0 Control	10 Galactosa	20 1-Metil-D-Manósido	30 Melibiosa	40 D-Turanosa
1 Glicerol	11 Glucosa	21 1-Metil-D-Glucósido	31 Sacarosa	41 D-Lixosa
2 Eritrol	12 Fructosa	22 N-Acetil-Glucosamina	32 Trehalosa	42 D-Tagatosa
3 D-Arabinosa	13 Manosa	23 Amigdalina	33 Inulina	43 D-Fucosa
4 L-Arabinosa	14 Sorbosa	24 Arbutina	34 Melecitosa	44 L-Fucosa
5 Ribosa	15 Ramnosa	25 Esculina	35 Rafinosa	45 D-Arabitol
6 D-Xilosa	16 Dulcitol	26 Salicina	36 Almidon	46 L-Arabitol
7 L-Xilosa	17 Inositol	27 Celobiosa	37 Glucogeno	47 Gluconato
8 Adonitol	18 Manitol	28 Maltosa	38 Xilitol	48 2-Keto-Gluconato
9 $\beta$ -Metil-D-Xilosido	19 Sorbitol	29 Lactosa	39Gentiobiosa	49 5-Keto-Gluconato

#### **6.6.1.1. Preparación de las galerías API 50CH**

Cada galería estuvo constituida por 5 tiras conteniendo cada una de ellas 10 tubos numerados. Se preparó una cámara de incubación (tapa y charola) y se rotuló la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara de análisis. Posteriormente, se agregaron aproximadamente 10 mL de agua destilada en los recipientes del fondo de la charola para lograr crear una atmosfera húmeda. Se sacaron cada una de las tiras de análisis de su embalaje, para ser preparadas en dos tiras del 0-19, 20-29, 30-39, 40-49 y posteriormente se colocaron al fondo de la cámara de incubación.

#### **6.6.1.2. Preparación del inóculo.**

Dentro de un tubo de ensayo con 2 mL de agua destilada estéril, fueron colocadas varias colonias de cultivo reciente, en agar LSB con ayuda de un asa de siembra totalmente estéril. Posteriormente, se realizó una suspensión densa del tubo de agua destilada, se abrió el tubo de ensayo a la cual se le colocaron 5 mL de agua destilada estéril y se realizó una suspensión de turbidez de la misma manera que el patrón 2 de McFarland, transfiriendo la suspensión mediante goteo. El patrón de McFarland más utilizado es al 0.5% y corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de  $1.5 \times 10^8$  células bacterianas por mL. Se abrió una ampolla de API 50 CHL Medium y se inocularon 2 veces el número de gotas citadas (2n). La suspensión se realizó rápidamente y se homogenizo. La suspensión fue utilizada inmediatamente.

### 6.6.1.3. Inoculación de las galerías API, lectura e interpretación de resultados.

La suspensión bacteriana con ayuda de una pipeta estéril se inoculó en los 50 tubos de las galerías, tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Inclinar ligeramente hacia delante la cámara de incubación.
- Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.
- Al inocular en el tubo, no rebasar el límite superior del mismo con el fin de conservar una buena anaerobiosis.
- Recubrir la cúpula con aceite de parafina
- Incubar las galerías a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis durante 48 horas.

Para la lectura de las muestras, fue necesario incubar las muestras durante 48h. En cada tubo se buscó identificar la acidificación producida, la cual se traduce por el cambio de color, pasando de un color amarillo a purpura de bromocresol contenido en el medio. Por otro lado, en el ensayo de Esculina se pudo observar un viraje de color de púrpura a negro. El perfil bioquímico obtenido puede ser identificado a partir de la tabla de identificación (Cuadro 6.3).

Cuadro 6.3 Cuadro de identificación de perfil bioquímico pruebas API 20.

<b>Prueba</b>	<b>Reacción / Enzimas</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
ONPG	Beta-galactosidasa	Sin Color	Amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	Amarillo	Rojo o Naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o Naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o Naranja



CIT	Utilización del citrato	Verde	Azul/Turquesa
H2S	Producción de H <sub>2</sub> S	Sin precipitado negro	Precipitado negro
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo o naranja
TDA	Triptófano desaminasa	Amarillo	Marrón-rojo

---

### 6.6.2. Identificación bioquímica (Bacterias anaerobias)

Para la identificación bioquímica de bacterias anaerobias, fue utilizado el Kit API 20A. El kit API 20A es un sistema estandarizado compuesto por 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Los microtubos fueron inoculados con una suspensión bacteriana que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, espontáneos o provocados mediante la adición de reactivos. En el Cuadro 6.4, se muestran los substratos incluidos en los 20 recipientes de la galería enzimática para bacterias anaerobias API 20A.

Cuadro 6.4 Sustratos de pruebas bioquímicas incluidos en la galería enzimática para bacterias anaerobias API 20A.

Prueba	Sustrato
IND	L-triptófano
URE	Urea
GLU	D-glucosa
MAN	D-manitol
LAC	D-lactosa
SAC	D-sacarosa
MAL	D-maltosa
SAL	Salicina
XYL	D-xilosa
ARA	L-arabinosa
GEL	Gelatina
ESC	Esculina
GLY	Glicerol
CEL	D-celobiosa
MNE	D-manosa
MLZ	D-melecitosa
RAF	D-rafinosa
SOR	D-sorbitol
RHA	L-rhamnosa
TRE	D-trehalosa
CAT	Catalasa
SPOR	Esporas
GRAM	Coloración de Gram
COCC	Morfología

### **6.6.2.1. Preparación de las galerías API 20 A**

Para iniciar por la preparación de las galerías API 20A, fue necesario tener lista una cámara de incubación (tapa y charola). Posteriormente, se hizo la rotulación de la cepa en la lengüeta lateral de cada cámara. Consecutivamente, se repartieron 5 mL de agua destilada en los recipientes del fondo de la charola para crear una atmosfera húmeda. Para después sacar una galería API 20A de su envase y depositarla en la cámara de incubación. Una vez dentro se sacaron cada una de las tiras de su embalaje, se separaron en dos tiras del 0- 19, 20- 29, 30-39, 40-49 y se colocaron en el fondo de la cámara de incubación.

### **6.7.2.2. Preparación del inóculo**

Para la preparación del inóculo, se abrió un ampulla de medio API 20A, con la ayuda de un asa estéril de siembra se extrajeron varias colonias obtenidas sobre agar sangre en anaerobiosis, hasta obtener una turbidez final superior o igual a 3 en la escala de McFarland, para posteriormente homogeneizar la suspensión y utilizarla inmediatamente.

### **6.6.2.3. Inoculación de las galerías, lectura e interpretación de resultados.**

La suspensión bacteriana con ayuda de una pipeta estéril se inoculó la galería API 20 A. Durante su inoculación, la galería fue ligeramente inclinada con la finalidad de evitar la formación de burbujas. Para realizar la prueba GEL, se llenó el tubo hasta la cúpula, para la prueba IND, fue necesario rellenar solamente el tubo con la solución bacteriana y llenar la cúpula con aceite de parafina. Finalmente, la

cámara de incubación fue cerrada y las muestras fueron incubadas durante 48 h a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en cámara de anaerobiosis.

Después de 48 h de incubación, fue posible realizar la lectura de las muestras. Para aquellas muestras que requieren la adición de reactivos extras, estos fueron añadidos y para los que no los necesitan su interpretación fue rápida y espontánea. El perfil bioquímico obtenido puede ser identificado a partir de la tabla de identificación (Cuadro 6.3).

### **6.6.3. Identificación bioquímica (*Enterobacterias*)**

La identificación de *Enterobacterias* se realizó mediante pruebas microbiológicas convencionales, tinción de Gram, catalasa, oxidasa. Finalmente se confirmó la identificación de las cepas con pruebas bioquímicas de rutina. Las cepas de enterobacterias a identificar se sembraron en agar soya tripticaseina (AST), y fueron incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 horas. Posterior a la incubación con ayuda de un asa en punta se inocularon los juegos de pruebas bioquímicas, los cuales consistieron en Citrato, Kligler, LIA, FAD, MIO, RM-VP, Urea y fueron incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 horas. Para posteriormente adicionar el reactivo siguiente a las pruebas que lo requieren y se procedió a su interpretación.

El perfil bioquímico obtenido puede ser identificado a partir de la tabla de identificación (Cuadro 6.3)

### **6.6.4. Identificación de *Bacillus sp***

De las colonias desarrolladas en medio MYP se realizó la tinción de Gram y tinción de endosporas, así como la prueba de la catalasa. Se seleccionaron todos los aislados que fueran bacilos Gram positivos con presencia de endosporas, catalasa positiva y crecimiento en aerobiosis.

## **6.7. Perfil de metabolitos microbianos mediante cromatografía HPLC-DAD-MS**

Para la identificación de los metabolitos microbianos se realizó de acuerdo con el método propuesto por Blancas Benítez (2018) utilizando un HPLC Agilent Sistema de la serie 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.), equipado con un detector de matriz de diodos UV-Vis (DAD). Las muestras se inyectaron (10  $\mu$ L, velocidad de flujo 0.4 mL / min) en un Poroshell 120 EC-C18 columna (4,6 mm  $\times$  150 mm, tamaño de partícula 2,7  $\mu$ m) (Agilent Tecnologías). La elución en gradiente se llevó a cabo usando agua que contenía ácido trifluoracético al 0.1% (Sigma Aldrich) como disolvente A y acetonitrilo (Sigma Aldrich) como disolvente B y se aplicaron de la siguiente manera: 0 min, 5% B; 10 min, 23% de B; 15 minutos, 50% de B; 20 min, 50% de B; 23 min, 100% B; 25 min, 100% B; 27 min, 5% B, 30 min, 5% B. La detección fue realizada a 280-320 nm.

Para el análisis de MS, un 6120 Agilent Quadruple LC / MS equipado con una interfaz de ionización electrospray se utilizó en modo de ionización negativa con las siguientes condiciones: flujo de gas de secado (N<sub>2</sub>), 13.0 L / min; presión del nebulizador, 40 psi; secado de gas temperatura, 350 °C; y voltaje capilar, 3500 V. El análisis de datos se realizó con el software OpenLab CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.).

La caracterización de los compuestos se basó en el tiempo de retención y los datos de espectrometría de masas, los compuestos fueron detectados primero usando una sola exploración de MS en el Rango de 100-1100 m / z seguido de una búsqueda específica basada en los picos mostrando señales principales en los cromatogramas UV-Vis. Los valores se expresaron en unidades de área relativa para los compuestos identificados. A continuación, en el cuadro 6.5 se pueden observar los estándares para HPLC utilizados, así como sus concentraciones menor y mayor.

Cuadro 6.5 Estándares utilizados en HPLC y sus concentraciones en unidades de área

Estándar	Concentración Mínima	Concentración Máxima
4 - ácido hidroxibenzoico	0	793426.7
ácido trans-cinámico	4005.1	59818.3
ácido p-Coumarico	8575.5	2230291.8
ácido vanílico	0	58217.3
3-(2,4-dihidroxifenil) propionico	5955.3	1543423.6
ácido siríngico	13431	68312.8
Naringerina	11129.7	5578964.5
Quercetina	6684.8	3277209.3
Ácido clorogenico	0	1834748
Galocatequina galato	3994.6	626329
Ácido 3-hidroxibenzoico	3122.1	177161.8
Ácido 4-hidroxifenilacetico	2777.5	175260.1
Ácido 2-hidroxicinámico	3919.8	1109355.9
Ácido 3, 4 dihidroxifenilacetico	2912.8	493021.3
Ácido cafeico	8052.9	2614609
Ácido trans-ferúlico	1196.9	349944.2
Ácido sinápico	0	430805.1
Urolitina A	7925.8	1347412.9
Hidrato de catequina	0	289380.1
Galocatequina	0	5332.8
Ácido p-hidroxibenzoico	0	396893.8
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	4360.6	1348429.3
3-(4-hidroxifenil) propionico	0	53310.6
Ácido gálico	10491.1	856282.3
Kaempferol	59626.8	6235623.5
Ácido ferúlico	11052	338546.2
Ácido Elágico	27001.1	1007555.1
Capsaicina	2125.9	215835.5
Miricetina	9776.2	1937085.9
Mangiferina	12368.2	1787827.4
Ácido benzoico	1487.57	8903.4
Ácido Salisílico	4478.1	1795814.5
Ácido shikimico	1165.9	78521.1
Ácido etil ester protocatequico	40640	3834894

Gossipin	6456.5	1776276.9
Luteolina	37574.1	3501268.3
Dihidrocapsaicina	1340	74132.1
Metanol de ácido siríngico	3096.1	68312.8
Metanol de galocatequina	2595.2	3162.6
Ácido siríngico H <sub>2</sub> O	14323.6	19784.6
Ácido 4-hidroxifenilacetico	0	379082.3

### 6.8. Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa.

Para probar la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa, se utilizaron 25  $\mu$ l de extracto de fermentación colónica obtenido a las 48 h de fermentación o 25  $\mu$ l de medio de cultivo (Blanco) se mezcló con una solución de almidón (4 %), se agregaron 25  $\mu$ l de la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus Licheniformes* y posteriormente fue incubado a 37°C durante 1 h. Posteriormente, se agregaron 4 mL de NaOH 0.1 M y se aforó a 10 mL. Finalmente se tomaron 250  $\mu$ l de muestra y agregaron 500  $\mu$ l de GOD-POD y se incubó durante 15 min a 37°C. La absorbancia se midió a 505 nm en un espectrofotómetro (Jenway, 6715, USA). El % de inhibición se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Abs Blanco} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Blanco}} \times 100$$

### 6.9. Análisis Estadístico.

Los resultados de las variables continuas durante las etapas del proyecto fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones. Para los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con la prueba Tukey, reportándose las diferencias significativas cuando  $p < 0.05$ ,

realizando entonces un análisis de medias con un nivel de confianza de 95%.  
Todos los análisis se realizaron con el software STATISTICA, versión 12.0  
(StatSoft. Inc. 1984–2007, Tulsa, OK, EE.UU.)



## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Composición proximal de los refrigerios y Fracción Indigestible

En el Cuadro 7.1 se muestran los resultados obtenidos de la composición proximal y el contenido de fracción indigestible (FI) insoluble, soluble y total en los refrigerios. Se obtuvieron tres formulaciones las cuales se nombran F1, F2 y F3, con un refrigerio control (RC). De acuerdo con los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas con respecto a la humedad ( $p>0.05$ ). La humedad de los refrigerios se encontró entre valores promedio que van desde 16.48 hasta 19.59 %. Con respecto a los carbohidratos solubles totales, se observó que el refrigerio control (RC) presentó el menor valor con 37.40 g/100g. Además, la F1 presentó el mayor contenido con un 69.27 g/100g, esto podría deberse a que esta formulación es la que presenta una mayor cantidad de cáscara de mango. Rodríguez y cols. (2018) mencionan que la cáscara contiene 63.80 g/100g de carbohidratos. Por otro lado, el contenido de cenizas que presentaron estos refrigerios muestran una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre la F1 y la barra control con valores de 2.7 y 1.35 % respectivamente. El valor presente en la F1 (70:30) es similar a lo reportado por Ramírez-Maganda y cols. (2015) quienes reportaron un contenido de cenizas en cáscara de mango del 2.6 % en panecillos con subproductos de mango, sin embargo, las muestras de la F2 y F3 no muestran ninguna diferencia entre ellas (F2: 2.44, F3; 2.38 %), teniendo valores menores, comparado con la F1. Con respecto a la cantidad de lípidos presentes en la muestra no presentaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las formulaciones con subproductos de mango (SM), sin embargo, el RC si mostró diferencias significativas ( $p>0.05$ ), obteniendo el valor más alto (1.32 %) con respecto a las formulaciones con SM. Esto coincide con lo reportado por Elichalt y cols. (2017) quienes mencionan que la harina de trigo tiene regularmente un total de 1.28 % de lípidos. Por otro lado, se encontró que entre los refrigerios los valores de la FI soluble no presentaron diferencia significativa ( $p>0.05$ ) con valores máximos de

7.31 %. Es considerado que la ingesta de FI soluble es de gran importancia, debido a que este ayuda a modular el paso del alimento en el tracto gastrointestinal, ayudando a una mejor absorción de los nutrientes y generando una sensación de saciedad prolongada (Chamorro y Mamani, 2015).

Cuadro 7.1 Composición proximal y fracción indigestible (FI) de los refrigerios elaborados con subproductos de mango y refrigerio control (g/100g).<sup>1</sup>

	Refrigerios			
	F1	F2	F3	RC
Humedad	19.59 ± 3.21 a	18.25 ± 1.99 a	17.96 ± 2.03 a	16.48 ± 1.30 a
CST	69.27 ± 1.75 a	62.04 ± 0.82 b	65.95 ± 0.95 a	37.40 ± 2.88 c
Cenizas	2.70 ± 0.088 a	2.44 ± 0.018 b	2.38 ± 0.085 b	1.35 ± 0.002 c
Lípidos	0.70 ± 0.51 a	0.50 ± 0.23 a	0.33 ± 0.09 a	1.32 ± 0.20 b
FIT	30.11 ± 1.02 a	32.25 ± 1.20 a	32.27 ± 1.84 a	20.38 ± 0.67 b
FIS	7.31 ± 1.9 a	4.81 ± 0.66 a	6.63 ± 1.23 a	7.05 ± 1.48 a
FII	22.79 ± 2.93 a	27.44 ± 1.41 a	25.64 ± 3.02 a	13.32 ± 0.91 b

<sup>1</sup> Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes por columna indican diferencia significativa entre los refrigerios por variable analizada (ANOVA, Fisher LSD, p<0.05). Carbohidratos solubles totales, CST. Refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (70:30), F2 (70:15:15), F3 (70:7.5:22.5). Barra control, BC.

En cuanto a la FI insoluble, se encontró una diferencia significativa (p>0.05) entre la barra control con 13.32 % con respecto a las formulaciones con subproductos de mango (F1: 22.79 %, F2: 27.44 %, F3: 25.64). Chamorro y Mamani (2015) relacionan la ingesta de FI insoluble con una mayor motilidad en el colon y con alivio eficaz contra algunos trastornos digestivos como estreñimiento y constipación. Por otro lado, en la FI total, se observó una diferencia significativa

( $p > 0.05$ ) entre las formulaciones con subproductos de mango (F1: 30.11 %, F2: 32.25 %, F3: 32.27 %) con respecto a la barra control la cual presentó un 20.38 %. Duarte-Valenzuela y cols. (2016) menciona que la FI es sumamente importante en los alimentos ya que la FI insoluble ayuda a la motilidad intestinal y la FI soluble influye en la disminución del vaciamiento gástrico, envía señales de saciedad e incrementa la viscosidad en el intestino delgado; también sirve de sustrato fermentativo para la microbiota colónica.

## 7.2. Cambios en el pH

En la Figura 7.1 se muestran los resultados de pH obtenidos durante la fermentación colónica de los refrigerios elaborados con subproductos de mango en los diferentes tiempos de fermentación. En el tiempo 6 h de fermentación se observaron diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ ) siendo la F1 (70 pasta: 30 cáscara: 0 semilla) la que muestra una mayor disminución (5.52) con respecto a los refrigerios con SM, sin embargo, el RC es quien muestra el valor de pH más bajo (5.22). Una vez transcurridas las 12 h de fermentación, hubo un ligero descenso de pH en todas las formulaciones con SM mostrando que no existe diferencia significativa entre los refrigerios ( $p > 0.05$ ), excepto para el refrigerio control, donde el pH incrementa con el tiempo. Por otro lado, se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las muestras de los refrigerios durante las 24 h de fermentación, obteniendo un valor de 5.53 para la F1 como valor menor, siendo esta la formulación con mayor fermentabilidad. Durante el tiempo 48 h se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las distintas formulaciones y RC, siendo la F1 quien muestra un pH menor (5.43) en comparación con la F2, F3 y RC. Con respecto a su análisis estadístico entre los tiempos de fermentación por muestra se logró observar que para la barra control existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) teniendo el valor menor en 5.22 para el tiempo 6 h, y mostrando un incremento entre los demás tiempos con un valor de final de 6.09. Esto podría indicar que fracción indigestible del refrigerio con harina de trigo, no es un producto tan

fermentable. Por otro lado, la F1 (70:30:0) no muestra diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre sus tiempos de fermentación con un pH inicial de 5.52 y un pH final de 5.43.

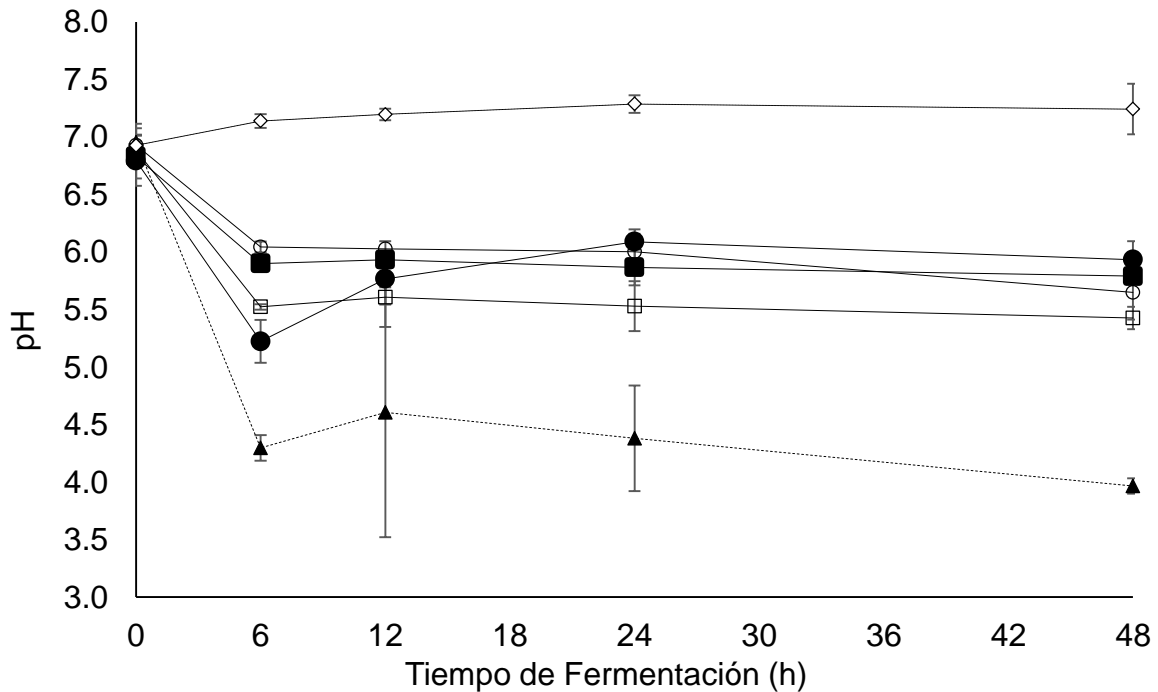


Figura 7.1 Cambios de pH durante la fermentación colónica de la fracción indigestible en control negativo (◇), rafinosa (▲), refrigerio control (●), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, 70:30 (□); F2, 70:15:15 (■); F3, 70:7.5:22.5 (○).

Sin embargo, esta formulación es la que muestra una mayor disminución de pH al transcurrir el tiempo de fermentación, concluyendo para esta muestra que la cascara y pasta de mango son los subproductos mayormente fermentables, esto debido a su alta concentración de fracción indigestible. Para la F2 (70:15:15) y F3

(70:7.5:22.5) no muestran diferencias significativas al paso del tiempo. Sin embargo, la F2 muestra una mayor fermentabilidad al paso del tiempo, esto podría deberse a la concentración de harina de semilla de mango, debido que se considera que con la adición de esta se dio un aumento del contenido de polifenoles no digeribles, los cuales fueron considerados como un sustrato potencial para la microbiota colónica (Cruz-Trinidad y cols., 2019) y así, disminuir el pH. Asimismo, el control positivo (rafinosa) muestra pH bajos en comparación con las muestras iniciando en 4.30 para el tiempo 6 h y 3.97 para el tiempo 48h, mostrando una disminución de pH al paso del tiempo, siendo lo contrario para el control negativo, el cual muestra un pH hasta de 7.29, mostrando una menor fermentabilidad. Sáyago-Ayerdi y cols. (2019) mencionan que la cáscara de mango, tiene altas cantidades de fracción indigestible, por lo cual este subproducto es considerado altamente fermentable, obteniendo así una disminución de pH al transcurrir las 48 h de fermentación planteadas para este experimento. Por otro lado, también es considerado que la pasta de mango cuenta con un alto contenido de fracción indigestible, y compuestos fenólicos los cuales al llegar al colon son altamente fermentables y pueden producir un efecto benéfico a la salud del consumidor (Zavala, 2019).

### **7.3 Capacidad Antioxidante DPPH, FRAP y Fenoles Solubles Totales (FST)**

La determinación de FST, fue realizada sobre los sobrenadantes de fermentación obtenidos de los tiempos 6, 12, 24 y 48h expresados en  $\mu\text{g GAE /mL}$  (Figura 7.2). En donde el valor más alto lo obtuvieron las muestras F2 (144.47  $\mu\text{g GAE /mL}$ ) y F3 (147.32  $\mu\text{g GAE /mL}$ ) en comparación con la muestra F1 (113.79  $\mu\text{g GAE /mL}$ ) a las 12 h ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, al llegar a las 48 h, F1 mostró casi dos veces más contenido de FST que F2 y F3. El contenido de FST para la RC oscilo entre 13 y 49  $\mu\text{g GAE /mL}$  de EF. Como se puede observar, los valores obtenidos para esta determinación al paso de los diferentes tiempos de fermentación las concentraciones más altas de FST se encuentran en las muestras que contienen

SM (F1: 148.22, F2: 155.78, F3: 150.41) durante las 6h, y al transcurrir las horas esta concentración va disminuyendo paulatinamente; Esto podría deberse a la cantidad de FI presente en los refrigerios en conjunto con la fermentación colónica a la que son sometidos estos compuestos bioactivos, los cuales podrían ir disminuyendo debido al aprovechamiento de los mismos por la microbiota presente. Por lo que se ha sugerido que la incorporación de SM a refrigerios tipo barra incrementa el contenido de polifenoles (galotaninos o elagitaninos) asociados a la FI, los cuales pueden ser descarboxilados por la microbiota y liberar compuestos antioxidantes como el ácido gálico o ácido elágico (Hernández-Maldonado y cols., 2019).

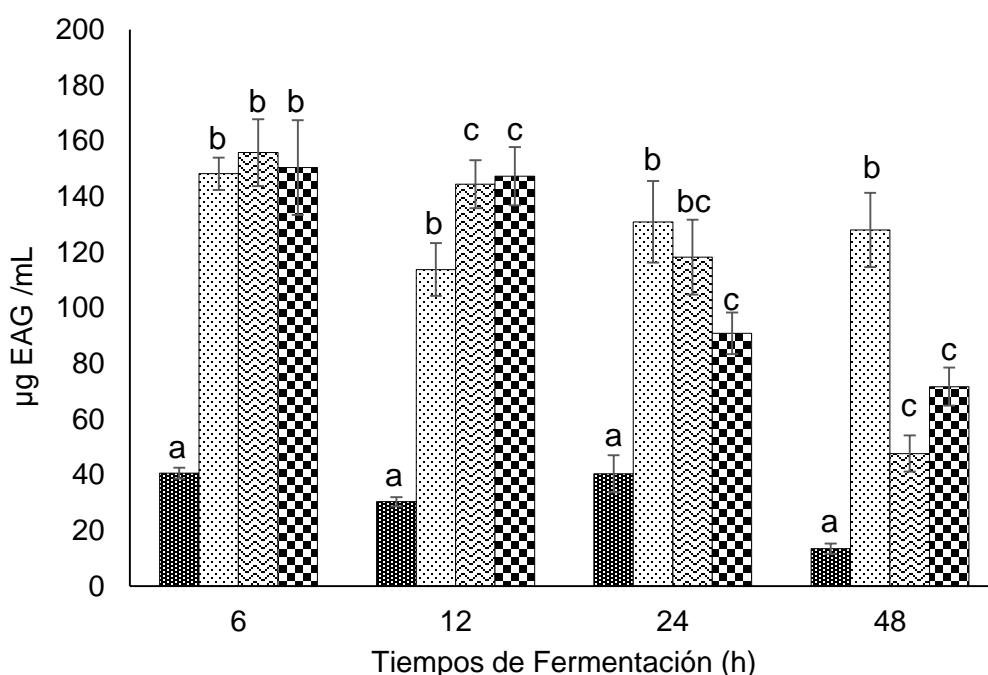


Figura 7.2 Concentración de Fenoles Solubles Totales en un refrigerio control (RC , ■), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (▨), F2 (▩), F3 (▧)

En cuanto a la capacidad antioxidante DPPH en la Figura 7.3, se observó que las formulaciones con subproductos de mango mostraron una mayor actividad reductora, con una concentración 1670 y 1931  $\mu\text{M ET/L}$  durante el tiempo 12 h. Aunque a las 12 h de fermentación se presentó la mayor actividad, fue notorio que en los tiempos 6 y 24 h, también se encontró un valor de FST superior en los refrigerios con SM respecto al control, excepto a las 48 h donde no existió diferencia entre las muestras ( $p>0.05$ ). Entre los principales polifenoles presentes en el mango y sus subproductos se encuentran los ácidos fenólicos, que son moléculas pequeñas y, por lo tanto, al estar asociadas a la fracción indigestible pueden liberarse producto de la hidrólisis enzimática por la microbiota colónica. Estos compuestos podrían reaccionar con el radical lo que da como resultado valores de DPPH más altos (Blancas-Benitez y cols., 2015).

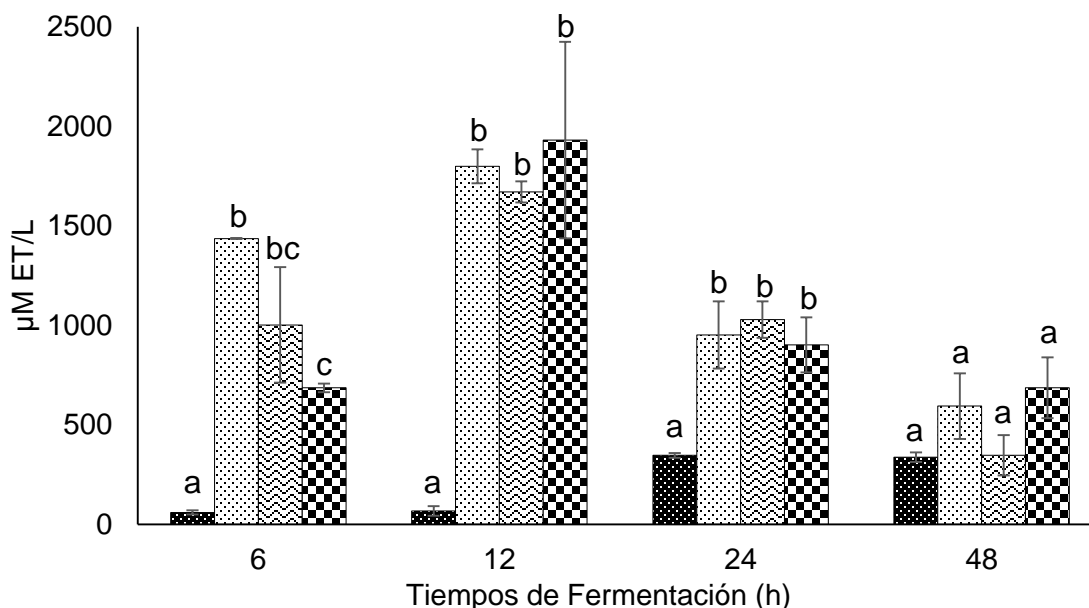


Figura 7.3 Capacidad antioxidante DPPH de un refrigerio control (RC), los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, F2, F3

Por otro lado, quien mostró una menor capacidad antioxidante DPPH es la RC hecha con harina de trigo, con una concentración mayor de 346.08  $\mu\text{M ET/L}$  durante el tiempo 24 h y una concentración menor (53.80  $\mu\text{M ET/L}$ ) en el tiempo 6 h, esto solamente confirma que la adición de SM a los refrigerios mejora la capacidad antioxidante de los refrigerios. Durante la obtención de estos valores, se logró observar una disminución hasta del 4 % aproximadamente de la F2 y F3 con respecto a la F1. Esto podría ser debido a la adición de semilla a la F2 y F3, ya que las reacciones que tiene el radical DPPH con ciertos fenoles como el eugenol, presente en la semilla de mango y sus derivados, interfiere directamente en los resultados, arrojando valores bajos de actividad antioxidante (Bondet y cols., 1997).

También se realizó la determinación de CAOX por el método de actividad quelante FRAP en los sobrenadantes obtenidos por la fermentación colónica en los tiempos 6, 12, 24 y 48 h (Figura 7.4). Durante esta determinación se encontró que la F1 cuenta con una actividad quelante de 3140.41  $\mu\text{M ET/L}$ , y no mostró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) con respecto a la formulación F2 y F3 (2945.77 y 2927.24  $\mu\text{M ET/L}$  respectivamente). Sin embargo, la RC presentó los valores menores (1495.7  $\mu\text{M ET/L}$ ) en comparación con las formulaciones con SM. Lo que podría indicar que la harina de trigo presenta una actividad quelante muy baja y los SM aumentan el contenido de compuestos quelantes. Como se muestra en el Figura 7.4 hay una disminución al paso del tiempo, además de una pequeña disminución entre cada formulación, esto podría deberse a la biotransformación de los compuestos iniciales con mayor actividad hasta compuestos con menor actividad en los tiempos finales de fermentación.



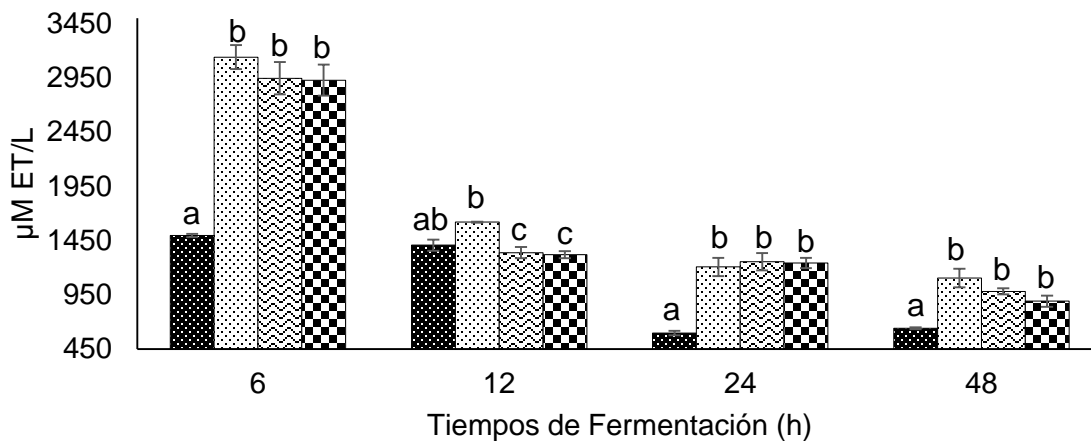






Figura 7.4 Capacidad antioxidante FRAP de un refrigerio control (RC ) , y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 () , F2 () , F3 () .

#### 7.4. Identificación y aislamiento de bacterias de la microbiota

La identificación de microorganismos presentes en la microbiota fue realizada en los residuos obtenidos de la fermentación colónica a las 6, 12, 24 y 48 h los cuales fueron expresados en UFC/g. En donde podemos observar que se encontraron en cantidades considerables grupos bacterianos como *Enterobacterias*, *Bifidobacterias*, *Lactobacillus*, *Bacillus sp.* Los cuales no presentaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de fermentación, excepto para *Bifidobacterias*. En cuanto a las *Enterobacterias* (Ver Figura 7.5) se observó presencia de las mismas desde  $1.21 \times 10^5$  hasta  $6.98 \times 10^8$  UFC/g de muestra, presentando mayor concentración entre las 6 y 12 h de fermentación. Jiménez-Vera y cols. (2006) mencionan que dentro del colon humano existen *Enterobacterias* en cantidades pequeñas, las cuales se caracterizan por ser oportunistas. Sin embargo, también encontraron que estas disminuyen el consumo de prebióticos aproximadamente a las 24 h de fermentación.

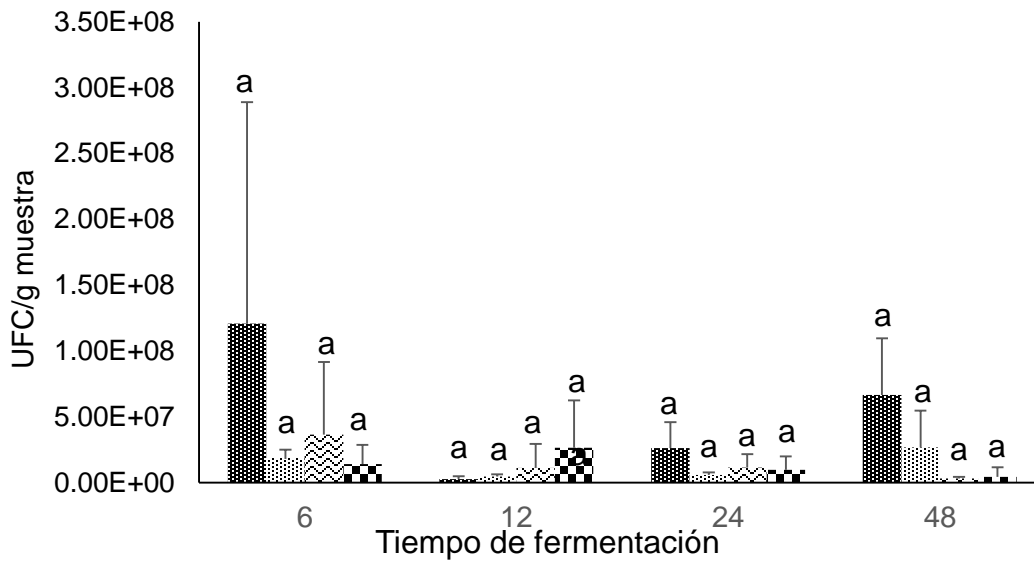


Figura 3.5 Identificación de Enterobacterias en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, F2, F3.

Por otro lado, se encontró la presencia de *Bifidobacterias* (Ver Figura 7.6) y se determinó que durante el tiempo 6, 12 y 24 h de fermentación no se observó diferencia significativa entre las muestras. Sin embargo, durante las 48 h de fermentación la F1 mostró una menor presencia de *Bifidobacterias* ( $3.71 \times 10^7$  UFC), siendo la F3 de este mismo tiempo que mostró una mayor cantidad ( $5.02 \times 10^8$  UFC) con respecto a todas las formulaciones y tiempos de fermentación. Diversos autores mencionan que la presencia de este grupo bacteriano en la microbiota colónica es de gran importancia debido a que ayuda a modular gran parte de la simbiosis. Schroeder y cols. (2018) mencionan que las *Bifidobacterias* son un género de vital importancia para lograr mantener un colon sano, ya que su ausencia podría desencadenar defectos graves en el moco colónico generando enfermedades como colitis.

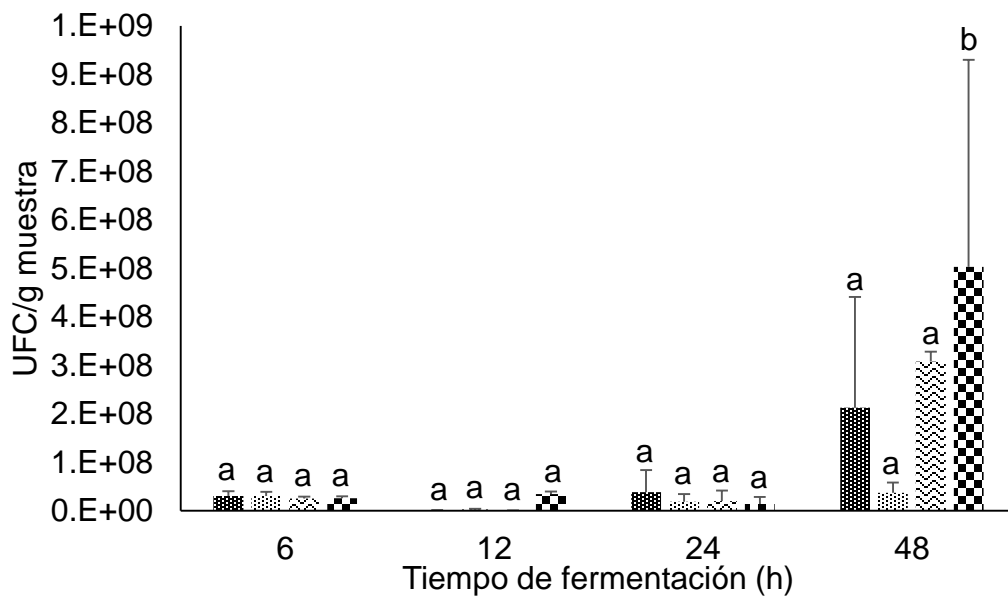


Figura 7.6 Identificación de *Bifidobacterias* en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, F2, F3.

La presencia de *Lactobacillus* fue de  $2.03 \times 10^5$  hasta los  $3.45 \times 10^8$  UFC/g de muestra, la presencia de este género bacteriano en la microbiota analizada, no mostro diferencias significativas entre muestras y los tiempos de fermentación (Figura 7.7). Sin embargo, las muestras que obtuvieron una mayor cantidad de *Lactobacillus* fue la F2 ( $1.31 \times 10^8$  UFC) y F3 ( $1.36 \times 10^8$  UFC) a las 48 h de fermentación. Los *Lactobacillus* son un género bacteriano que se encuentra presente dentro de una de las principales divisiones que habitan el colon humano, el cual se encuentra presente desde el nacimiento del ser humano, y se sigue manteniendo durante sus primeros meses de alimentación materna, logrando mantenerlos al seguir con una alimentación balanceada (Montero, 2019).

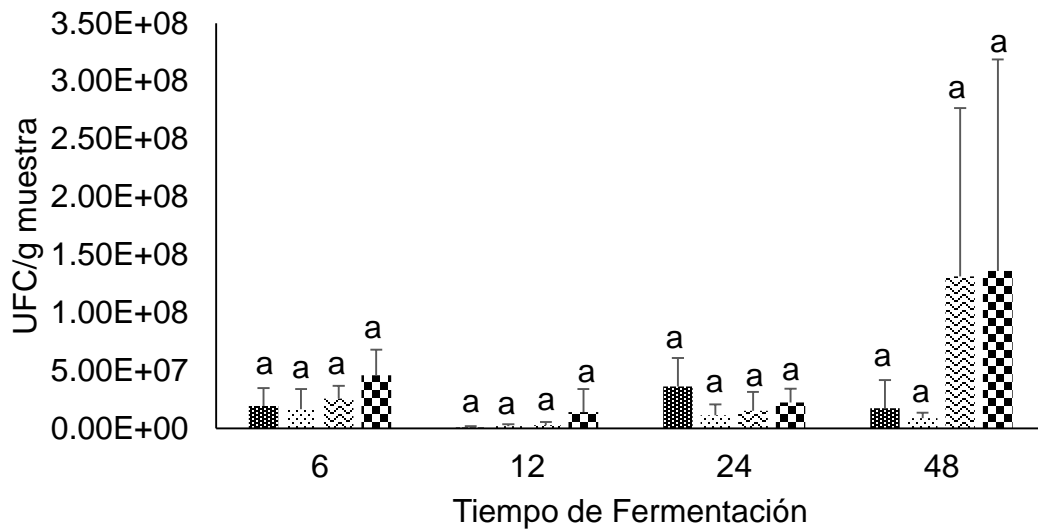


Figura 7.7. Identificación de *Lactobacillus* en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, F2, F3.

Por otro lado, Ni y cols. (2019) menciona que en cuanto a la cantidad de *Lactobacillus* presentes en la microbiota colónica de una persona joven, no es diferente a la de una persona anciana, sin embargo, esta puede ser deficiente si el hospedero cuenta con alguna enfermedad. La mayoría de los productos probióticos se basan en una o más cepas de *Lactobacillus*, lo cual está asociado con un aumento del número de *Lactobacillus* en el colon, por tanto, modifica positivamente la composición y función de la microbiota intestinal. Sáyago-Ayerdi y cols. (2019) mencionan que la cáscara de mango podría promover la producción de *Bifidobacterias* al llegar a las 24h de fermentación colónica, mientras que al llegar a las 72 h de fermentación existe una mayor producción de *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*. Sin embargo, a diferencia de este trabajo la metodología utilizada por el investigador anterior fueron técnicas moleculares, las cuales son mucho más específico en comparación con el método empleado

En cuanto a la presencia de *Bacillus sp.* este no mostró diferencias significativas entre las muestras analizadas a los diferentes tiempos de fermentación mencionados con anterioridad (Ver Figura 7.8). Encontrando valores desde  $3.17 \times 10^5$  hasta los  $3.90 \times 10^7$ . Sin embargo, la formulación con mayor presencia de este género fue el control positivo, esto podría deberse a que este es un glucósido trisacárido altamente fermentable en el colon. Sarkar y Banerjee (2019) mencionan que el género *Bacillus sp.*, puede generar un efecto benéfico en personas con enfermedades neuronales como Parkinson, ya que al estar presente en el colon o bien ser consumida como probiótico esta puede convertir la L-tirosina en L-Dopa convirtiéndose esta en dopamina, sustancia que genera un efecto benéfico en el sistema nervioso humano.

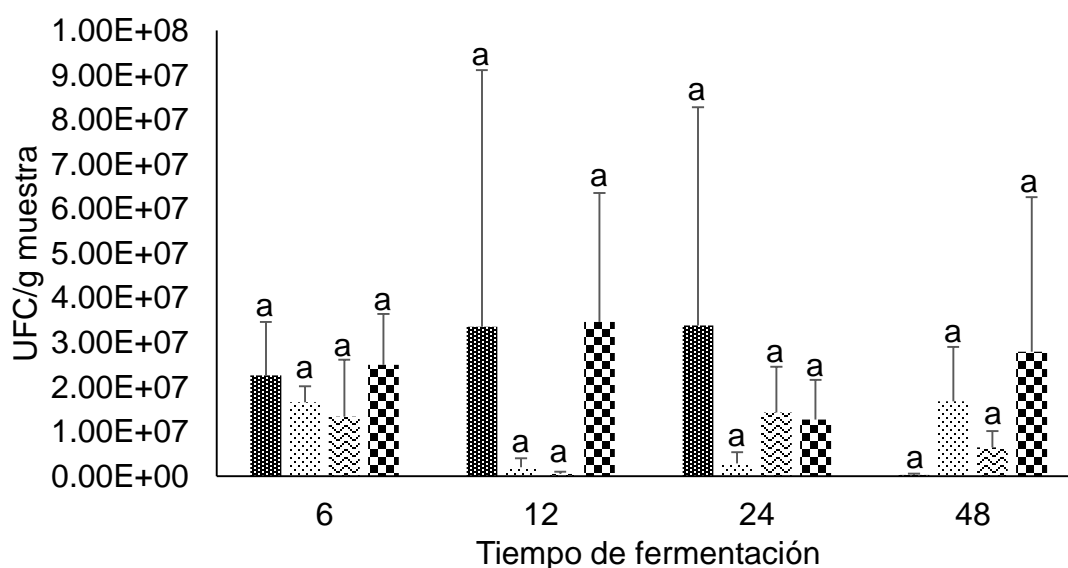


Figura 7.8 Identificación de *Bacillus sp.* en los residuos de fermentación colónica de un refrigerio control (RC), y los refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1, F2, F3.

## **7.5. Identificación del perfil de metabolitos microbianos mediante HPLC-DAD-MS.**

Para la identificación del perfil de metabolitos microbianos mediante cromatografía líquida, se procesaron los sobrenadantes de la fermentación colónica de los refrigerios a base de subproductos de mango a las 0, 6, 12, 24 y 48h de fermentación, los cuales fueron expresados en  $\mu\text{Mol}$ . En el cuadro 7.2, se puede observar la presencia de ácido genticóico, el cual está asociado con efectos benéficos en la salud de quien lo consume, beneficios tales como actividad antiinflamatoria, antitumoral, hepatoprotectores, neuroprotectores, antimicrobiana, y especialmente actividad antioxidante (Abedi y cols., 2020). Con respecto a la presencia del ácido genticóico en las muestras de fermentación colónica de subproductos de mango se puede observar que durante el tiempo 0 de fermentación no hay presencia de este compuesto, y se mantiene de esta manera para las muestras del refrigerio control y control positivo para todos los tiempos, sin embargo, para la F1, F3 y control negativo se comienza a observar la presencia de este ácido durante las 6h de fermentación. Al transcurrir 12 h de fermentación se observó la presencia en las formulaciones 1, 2 y 3 además del control negativo observando un ligero aumento entre estas, al llegar a las 48h de fermentación se observó la concentración más alta de ácido genticóico en las formulaciones con subproductos de mango, perdiendo presencia en el control negativo. En cuanto al análisis estadístico realizado se observó que existe diferencia significativa para el tiempo 48 en la F1 y F2, siendo la primera quien muestra la mayor cantidad de ácido genticóico con  $14.9 \mu\text{Mol}$ .

Cuadro 7.2 Concentración ( $\mu\text{Mol}$ ) de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción indigestible asilada de refrigerios elaborados con subproductos de mango.<sup>1</sup>

Tiempo	Muestra					
	F1	F2	F3	RC	C+	C-
<b>Ácido Gentísico</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	7.15 $\pm$ 1.55 a A	ND	1.59 $\pm$ 1.49 a A	ND	ND	1.75 $\pm$ 0.46 a A
12	9.28 $\pm$ 3.56 a A	0.87 $\pm$ 0.02 a A	6.39 $\pm$ 3.88 a A	ND	ND	1.82 $\pm$ 0.54 a A
24	11.13 $\pm$ 4.05 a A	7.75 $\pm$ 4.98 a A	7.76 $\pm$ 0.87 a A	ND	ND	1.47 $\pm$ 0.83 a A
48	14.9 $\pm$ 14.58 b A	3.54 $\pm$ 3.99 a A	7.06 $\pm$ 1.26 ab A	ND	ND	ND
<b>Ácido Protocatéquico</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	10.05 $\pm$ 1.79 a A	4.75 $\pm$ 4.37 a A	6.68 $\pm$ 0.65 a A	21.13 $\pm$ 6.36 a A	ND	ND
12	3.35 $\pm$ 0.07 a A	3.29 $\pm$ 2.71 a A	5.67 $\pm$ 4.2 a A	77.89 $\pm$ 61.35 b B	111.98 $\pm$ 36.66 b A	ND
24	ND	ND	5.31 $\pm$ 0.3 a A	5.79 $\pm$ 1.76 a A	166.79 $\pm$ 29.57 b B	1.09 $\pm$ 0.56 a A
48	2.63 $\pm$ 0.5 a A	1.09 $\pm$ 0.19 a A	ND	ND	ND	0.68 $\pm$ 0.37 a A
<b>Ácido Vanílico</b>						
0	ND	ND	ND	0.27 $\pm$ 0 a A	ND	149.15 $\pm$ 257.86 a A
6	2508.67 $\pm$ 998.09 b B	238.67 $\pm$ 216.87 a	623.5 $\pm$ 449.37 a A	835.74 $\pm$ 481.85 A a	1031.03 $\pm$ 508.9 a A	0.27 $\pm$ 0 a
12	104.03 $\pm$ 60.23 a A	ND	35.01 $\pm$ 16.15 a A	738.05 $\pm$ 345.21 a A	589.57 $\pm$ 497.46 a A	25.11 $\pm$ 21.53 a A
24	ND	ND	57.41 $\pm$ 39.84 a A	86.49 $\pm$ 1.75 a A	235.34 $\pm$ 254.68 a A	0.27 $\pm$ 0 a A
48	102.48 $\pm$ 73.73 a A	ND	ND	118.22 $\pm$ 74.79 a A	4204.87 $\pm$ 1087.98 b B	0.27 $\pm$ 0 a
<b>Ácido Gálico</b>						
0	ND	ND	ND	ND	7 $\pm$ 0 a A	7 $\pm$ 0 a A
6	434.69 $\pm$ 35.19 b B	280.54 $\pm$ 87.35 bB	311.67 $\pm$ 39.63 b B	9.78 $\pm$ 0.55 a A	9.08 $\pm$ 3.6 a A	8.12 $\pm$ 1.95 a A
12	174.76 $\pm$ 106.16 b A	194.31 $\pm$ 55.45 b AB	77.83 $\pm$ 91.84 ab A	11.5 $\pm$ 2.07 a A	7.57 $\pm$ 0.99 a A	9.18 $\pm$ 3.09 a A
24	100.41 $\pm$ 56.73 a A	58.24 $\pm$ 23.06 a A	143.39 $\pm$ 172.01 a A	ND	7.24 $\pm$ 0.42 a A	7.84 $\pm$ 1.46 a A
48	33.95 $\pm$ 20.94 a A	65.5 $\pm$ 86.35 a A	23.7 $\pm$ 15.85 a A	ND	7 $\pm$ 0 a A	8.61 $\pm$ 2.79 a A
<b>Ácido Sinápico</b>						
0	ND	4.98 $\pm$ 0	ND	ND	13.02 $\pm$ 13.91 a A	13.84 $\pm$ 15.34 a A
6	24.89 $\pm$ 9.65 a A	29.32 $\pm$ 6.06 a A	25.6 $\pm$ 9.58 a A	25.16 $\pm$ 15.82 a A	16.99 $\pm$ 10.12 a A	18.09 $\pm$ 8.13 a A
12	22.64 $\pm$ 7.88 a A	20.16 $\pm$ 11.23 a A	33.23 $\pm$ 14.68 a A	37.84 $\pm$ 11.31 a A	24.31 $\pm$ 4.81 a A	22.58 $\pm$ 20.5 a A
24	30.13 $\pm$ 20.91 a A	24.98 $\pm$ 23.09 a A	34.56 $\pm$ 16.56 a A	14.04 $\pm$ 0.8 a A	21.73 $\pm$ 14.6 a A	43.38 $\pm$ 2.09 a A

<b>48</b>	33.08 ± 30.85 a A	62.86 ± 69.59 a A	69.16 ± 59.48 a A	27.91 ± 15.82 a A	26.71 ± 14 a A	40.91 ± 28.96 a A
<b>Maclurin</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	14.48 ± 4.79 a A	9.55 ± 4.63 a A	5.61 ± 7.92 a A	ND	ND	ND
<b>12</b>	12.53 ± 5.82 ab A	17.41 ± 4.15 b A	9.36 ± 2.68 ab AB	ND	ND	1.63 ± 0.15 a
<b>24</b>	7.27 ± 6.49 a A	7.02 ± 6.59 a A	5.14 ± 1.53 a A	ND	ND	ND
<b>48</b>	11.77 ± 1.57 a A	9.94 ± 7.23 a A	18.57 ± 10.82 a B	ND	ND	ND
<b>Catequina</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	12.57 ± 8.12 a A	15.88 ± 7.05 a AB	10.58 ± 3.18 a AB	ND	ND	13.48 ± 0 a A
<b>12</b>	12.72 ± 3.3 ab A	15.63 ± 6.76 ab AB	22.01 ± 10 b B	ND	15.9 ± 7.21 ab	4.9 ± 4.26 a A
<b>24</b>	12.5 ± 1.73 a A	6.39 ± 3.75 A	15.16 ± 3.83 a AB	14.74 ± 5.43 a	ND	11.27 ± 6.34 a A
<b>48</b>	15.3 ± 9.43 ab A	24.12 ± 10.29 b B	2.95 ± 0.37 a A	ND	ND	ND
<b>Ácido Elágico</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	3.49 ± 1.31 a A	6.95 ± 0.82 a A	6.07 ± 4.85 a A	7.33 ± 4.58 a A	3.11 ± 2.13 a A	3.32 ± 0.75 a A
<b>12</b>	3.08 ± 0.85 a A	6.17 ± 5.01 a A	2.79 ± 0.6 a A	3.14 ± 0.99 a A	6.39 ± 2.48 a A	20.85 ± 20.14 a A
<b>24</b>	5.65 ± 6.29 a A	5.66 ± 3.08 a A	4.11 ± 1.5 a A	8.22 ± 5.28 a A	4.5 ± 5.76 a A	5.97 ± 4.9 a A
<b>48</b>	7.15 ± 3.77 a A	6.49 ± 5.57 a A	9.92 ± 7.59 a A	4.75 ± 1.9 a A	6.1 ± 3.41 a A	4.15 ± 0.42 a A
<b>Mangiferina</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	234.75 ± 49.47 b B	14.5 ± 17.42 a A	11.54 ± 6.64 a A	ND	ND	ND
<b>12</b>	9.23 ± 2.25 a A	6.34 ± 0.88 a A	2.24 ± 1.07 a A	ND	ND	ND
<b>24</b>	17.63 ± 17.15 a A	4.51 ± 0.54 a A	3.61 ± 1.67 a A	ND	ND	ND
<b>48</b>	5.36 ± 3.75 a A	3.44 ± 2.52 a A	2.51 ± 1.63 a A	ND	ND	ND

<sup>1</sup> Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes por fila indican diferencia significativa entre los refrigerios por tiempo analizado (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05). Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencia significativa entre los tiempos de fermentación por muestra analizada (ANOVA, Tukey HSD p<0.05) Refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (70:30), F2 (70:15:15), F3 (70:7.5:22.5). Refrigerio control, RC.



En cuanto al análisis de las muestras con respecto al tiempo no hubo diferencia significativa. El ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) es un metabolito de la aspirina (ácido acetilsalicílico) (Lorico y cols., 1986) considerado como un polifenol bioactivo que se encuentra en muchas plantas alimenticias (melón amargo maduro, grosellas, kiwi, achicoria y trigo sarraceno, entre otros) (Horax y cols., 2010). Quirós-Sauceda y cols. (2017) reportan la presencia de ácido gentísico en pulpa y jugo de mango ataúlfo de 0.24 mg/100g de pulpa fresca y 0.18 mg / 750 g de jugo, también encontraron que este compuesto se logra encontrar después de hasta 4 h de ser consumido dentro del plasma, aumentando la cantidad de este compuesto si es consumido en jugo fresco. Sin embargo, no existen reportes de la presencia de este compuesto después de la digestión y fermentación colónica en subproductos de mango o en un producto alimenticio. De acuerdo con Sharma y cols. (2004) se ha demostrado que el ácido gentísico posee la capacidad de eliminar los radicales libres, además de ayudar en la restauración de enzimas antioxidantes, como la catalasa y glutatión peroxidasa. Además, el ácido gentísico se ha definido como una nueva clase de inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos potencialmente relevantes para el tratamiento del cáncer y las enfermedades relacionadas con la angiogénesis (Fernández y cols., 2010). Recientemente se ha demostrado que una concentración de 0.08 µg / mL de ácido gentísico redujo la frecuencia de micronúcleos en 76 % (24 h) y 79 % (48 h) reduciendo el daño inducido en un 11 % y un 21 %, respectivamente en células de hepatoma (tipo más común de cáncer primario del hígado) a pesar de presentar ausencia de citotoxicidad y actividad antiproliferativa (Cavalcante y cols., 2018).

Por otro lado, también hubo presencia de ácido protocatequico. Palafox, Gil-Chávez, y cols. (2012) mencionan que este es uno de los principales compuestos encontrados en el mango, que ha demostrado una relación inversa con la incidencia de distintas enfermedades, así como generar un efecto benéfico en la salud de quien lo consume. En el cuadro 7.2 se puede observar que, en cuanto al análisis estadístico realizado, si existe diferencia significativa por muestra entre los

distintos tiempos de fermentación colónica, observando los valores más altos para el refrigerio control (71.89  $\mu\text{Mol}$ ) y el control positivo (111.98 y 166.79  $\mu\text{Mol}$ ) a las 12 y 24 h, lo cual podría estar directamente asociado con la cantidad de harina de trigo presente en el refrigerio control. En cuanto a las formulaciones que contienen subproductos de mango no hubo diferencias significativas entre ellos, obteniendo los valores mayores la F1 a las 6 h de fermentación (10.05  $\mu\text{Mol}$ ), observando que al paso del tiempo este disminuye para todas las muestras. Por otro lado, para el análisis realizado por tiempo con respecto a cada una de las muestras no se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Se ha considerado que el ácido protocatéquico tenga un uso medicinal, debido a que es considerado un buen modulador de diversas enfermedades (Cavalcante y cols., 2018).

En cuanto al ácido vanílico encontrado en las muestras de fermentación colónica de los refrigerios a base de subproductos de mango, se observó que existen diferencias significativas entre las muestras con respecto al tiempo observando que a las 0 h de fermentación en las muestras con subproductos de mango este compuesto no se encuentra presente, sin embargo, al iniciar las 6 h de fermentación comienza su aparición, teniendo tendencia a disminuir con respecto al tiempo en todas las muestras. Las muestras que muestran mayor cantidad de ácido vanílico son la F1 a las 6 h de fermentación con 2508.67  $\mu\text{Mol}$ , y el control positivo arrojando 4204.87  $\mu\text{Mol}$  a las 48h de fermentación, con respecto a la F2 solo muestra presencia de este compuesto a las 6h de fermentación (238.67  $\mu\text{Mol}$ ), desapareciendo por completo en las horas posteriores. Para la F3, a las 6 h se obtuvo un valor de 623.5  $\mu\text{Mol}$  pero desaparece al llegar hasta las 48 de fermentación. Bazalar Palacios (2018) mencionan que el ácido vanílico se encuentra entre uno de los principales metabolitos presentes en el fruto de mango, el cual podría generar un efecto antihepatotóxico, ayudando a disminuir los daños causados por esta enfermedad en el ser humano. Por otro lado, investigaciones sugieren que el ácido vanílico está directamente relacionado con la disminución significativa de la expresión de ciclooxygenasa-2, ayudando a eliminar y/o mejorar los daños causados por colitis ulcerosa (Kim y cols., 2010).

Otro de los metabolitos encontrados en los sobrenadantes de fermentación colónica de estos refrigerios fue el ácido gálico, en cual se puede observar que existe diferencias significativas entre muestras con respecto al tiempo ( $p < 0.05$ ). Las formulaciones con subproductos de mango obtuvieron concentraciones mayores de ácido gálico, siendo la F1 quien mostró una mayor concentración (434.69  $\mu\text{Mol}$ ) con respecto a la F2 (280.54  $\mu\text{Mol}$ ) y F3 (311.67  $\mu\text{Mol}$ ) a las 6 h de fermentación. Sin embargo, las tres formulaciones mostraron una disminución en cuanto a la concentración con el paso del tiempo (23.7 a 65.5  $\mu\text{Mol}$ ). Es importante señalar que, el refrigerio control mostro valores de 9.78 y 11.5  $\mu\text{Mol}$  únicamente para los tiempos 6 y 12 h, respectivamente. El ácido gálico es considerado un metabolito importante para la salud colon-rectal, ya que se considera que está directamente relacionado con la salud del mismo, Velderrain-Rodríguez y cols. (2018) mencionan que el ácido gálico es un excelente auxiliar en la disminución de células cancerígenas en el colon al ser un compuesto altamente antiproliferativo. Por otro lado, el ácido gálico también está relacionado con propiedades anticancerígenas pero esta vez en cáncer de próstata, lo cual se ha comprobado en algunos estudios *in vivo* con ratones. Los cuales mencionan que el ácido gálico tiene grandes propiedades quimiopreventivas (Palafox, Yahia, y cols., 2012). Además del cáncer de próstata también se habla de la relación de este compuesto con la prevención de cáncer de colon ya que podría reducir el crecimiento de células tumorales y prevenir la aparición de lesiones precancerosas en el colon durante el inicio de la carcinogénesis (Corrales Bernal y cols., 2014).

Por su parte, el ácido sinápico, no muestra diferencias significativas con respecto a los distintos tiempos y diferentes muestras. Se encontraron valores entre 13 y 70  $\mu\text{Mol}$ . Sin embargo, este compuesto no se encontró presente a las 0 h de fermentación, mostró una ligera tendencia de aumento con respecto al tiempo. Los valores observados para las muestras con subproductos de mango van desde los 24.89 hasta los 69.16  $\mu\text{Mol}$ , siendo la F3 a las 48h de fermentación quien mostró la mayor cantidad de este compuesto.

Por otro lado, también fue identificado el compuesto Maclurin el cual durante el tiempo 0 de fermentación no mostró presencia, sin embargo, a partir de las 6 h de fermentación sus valores comenzaron a incrementar en las formulaciones que contienen subproductos de mango. La presencia de Maclurin muestra diferencias significativas entre los tiempos de fermentación por muestra analizada solamente para la F3, en donde a las 48h de fermentación se muestra una concentración de 18.57  $\mu\text{Mol}$ , siendo este tiempo y formulación quien muestra la mayor cantidad de este compuesto, mostrando una similitud en la misma formulación, pero a las 12h de fermentación con 9.36  $\mu\text{Mol}$ . Con respecto a la F1 y F2, estas no muestran diferencias significativas en este análisis estadístico ( $p>0.05$ ). En cuanto al análisis estadístico realizado entre los refrigerios por tiempo analizado podemos observar diferencias significativas entre estos ( $p<0.05$ ). Se encontró los valores mayores para la F2 a las 12h de fermentación con 17.41  $\mu\text{Mol}$ , teniendo una similitud con la F1 y F3 durante las 1 2h de fermentación. Con respecto a los tiempos 6, 24 y 48 h de fermentación, estos no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p>0.05$ ).

Por otro lado, se encontró la presencia de catequina, la cual al igual que algunos compuestos anteriores no mostró presencia a las 0 h de fermentación, sin embargo, a partir de las 6 h de fermentación este se hizo presente en las formulaciones con subproductos de mango, principalmente. En cuanto al análisis estadístico realizado entre los tiempos de fermentación por muestra no se observó diferencia significativa para la F1, sin embargo, para la F2 se detectó diferencias significativas, obteniendo el mayor valor para las 48h de fermentación (24.12  $\mu\text{Mol}$ ), teniendo similitud a las 6 y 12h de fermentación, obteniendo el valor más bajo a las 24h de fermentación con 6.39  $\mu\text{Mol}$ . En cuanto a la F3, está también mostró diferencias significativas entre los tiempos de fermentación observando el valor mayor a las 12 h de fermentación (22.01  $\mu\text{Mol}$ ), con similitudes a las 6 (10.58  $\mu\text{Mol}$ ) y 24 h (15.16  $\mu\text{Mol}$ ) de fermentación, disminuyendo la concentración a las 48h (2.95  $\mu\text{Mol}$ ). Para el análisis estadístico realizado entre los refrigerios por tiempo analizado se logró observar diferencias significativas a las 12 y 48h de fermentación con valores mayores de 22.01  $\mu\text{Mol}$  para F3 y 24.12  $\mu\text{Mol}$  para F2, respectivamente.

En cuanto a la presencia de ácido elágico, este se mostró a partir de las 6 h de fermentación para todas las muestras analizadas. En cuanto al análisis estadístico realizado no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación para ninguna de las formulaciones realizadas, ni entre los refrigerios por tiempo analizado ( $p > 0.05$ ). Para las formulaciones con subproductos de mango se obtuvieron valores que van desde los 2.74 hasta los 9.92  $\mu\text{Mol}$ , obteniendo el valor mayor en la F3 a las 48 h de fermentación.

Con respecto a la manguiferina, la cual se logró observar a partir de las 6 h de fermentación solamente para aquellas formulaciones que contienen subproductos de mango. La F2 y F3 no mostraron diferencias significativas entre ellas ni entre sus tiempos de fermentación. Sin embargo, para la F1, se observaron diferencias significativas en ambos análisis estadísticos, obteniendo los valores mayores a las 6 h de fermentación con 234.75  $\mu\text{Mol}$ , esta diferencia es entre los tiempos de fermentación por muestra, así como entre los refrigerios por tiempo analizado. Se ha reportado que la manguiferina puede ejercer actividad pro fármaco, al ser deglicosilado por *bacteroides sp*, también llamadas bacterias *MANG*, de esta manera se convierte en varios metabolitos los cuales pueden tener actividades biológicas más fuertes que el compuesto original en sí (Souza y cols., 2020). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la manguiferina tiene una actividad antiviral contra el herpes simple, así como actividad antioxidante y anti VIH (Sanugul y cols., 2005).

En el cuadro 7.3, se observa la concentración de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS, en donde se observa la presencia de 3-(4-Hidroxifenil) ácido propiónico. Para este compuesto el análisis estadístico entre los tiempos de fermentación por muestra, no mostró diferencia significativa para ninguna de las formulaciones analizadas. Sin embargo, entre los refrigerios por

tiempo analizado se logró observar diferencias significativas para las 6h de fermentación en el refrigerio control que presentó la mayor concentración (41.71  $\mu\text{Mol}$ ). En cuanto a las formulaciones que contiene subproductos de mango no se observaron diferencias significativas y los valores se encontraron entre 1 y 21  $\mu\text{Mol}$ .

El ácido 3,4-Dihidroxifenilacético fue encontrado a partir de las 6 h, teniendo una mayor concentración en la F1 con respecto a las otras dos formulaciones con subproductos de mango. Con respecto al análisis estadístico entre los tiempos de fermentación por muestra, no se observaron diferencias significativas para la F2 y F3 con respecto a las formulaciones con subproductos de mango, para el refrigerio control y el control positivo no se mostró presencia de este compuesto y para el control positivo se encuentra presencia, sin embargo, no mostró diferencias significativas. Con respecto al análisis entre los refrigerios por tiempo analizado se muestran diferencias significativas para las 6h de fermentación obteniendo el mayor valor en la F1 con 37.47  $\mu\text{Mol}$ , mostrando una similitud a las 24 h con 25.11  $\mu\text{Mol}$ . Para la F1 se encontró el valor más bajo a las 12 h de fermentación (19.06  $\mu\text{Mol}$ ).

Con respecto al compuesto 5-(3',4'-dihidroxifenil)-y-valerolactona fue identificado con el ion 207 y observado a partir de las 6h de fermentación, sin embargo, no mostró diferencias significativas entre los tiempos de fermentación por muestra, ni entre los refrigerios por tiempo analizado ( $p>0.05$ ). En cuanto a la presencia de este compuesto para los refrigerios con subproductos de mango, podemos observar que, a pesar de no mostrar diferencias significativas, en la F1 se encontró un ligero aumento con el paso del tiempo, pero es la formulación que menos presencia de este compuesto mostró (valores entre 7.12 y 12.53  $\mu\text{Mol}$ ). En cuanto a la F2 y F3 se observó una ligera disminución con el tiempo de fermentación. Por otro lado, también fue encontrado el compuesto Urolitina A, a partir de las 12 h de fermentación y solo en las formulaciones que contienen subproductos de mango. En cuanto al análisis estadístico realizado, se puede observar que existen diferencias significativas entre los tiempos de fermentación por muestra para la F3

a las 12h de fermentación, la mayor concentración (45.51  $\mu\text{Mol}$ ,  $p < 0.05$ ). Por otro lado, también se mostraron diferencias significativas entre los refrigerios por tiempo analizado y se encontró que a las 24 h de fermentación la F2 con 25.41  $\mu\text{Mol}$ , mostró mayor concentración sobre todo los tiempos.

La presencia de Noratiriol fue evidente únicamente en las formulaciones con subproductos de mango a partir de las 6 h de fermentación. Se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación para la F1 con la concentración más alta (129.72  $\mu\text{Mol}$ ) a las 12h de fermentación. Las formulaciones 2 y 3 estas no mostraron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación por muestra ( $p > 0.05$ ). En cuanto al análisis estadístico realizado entre los refrigerios por tiempo, la formulación uno es quien muestra algunas diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). A las 12 y 24, la F1 presentó la mayor concentración de este compuesto con 129.72 y 81.82  $\mu\text{Mol}$ . El noratiriol es conocido como el principal metabolito producido por una deglicosilación de mangiferina por bacterias colónicas. Este metabolito es un compuesto citotóxico contra células CaCO-2, mientras que también podría ser citostático contra las células A2402865 ( $\text{IC}_{50} = 51 \mu\text{M}$  para ambas células) (Souza y cols., 2020). Este compuesto también es conocido por ejercer algunas actividades antiinflamatorias, vaso relajantes y antiplaquetarias (Sanugul y cols., 2005).

Se identificó la presencia de galoil-glucosa en las formulaciones con subproductos de mango las cuales no mostraron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación con un rango de concentración de 10.5 a 25.23  $\mu\text{Mol}$ . En cuanto al análisis realizado entre los refrigerios por tiempo de fermentación tampoco se observaron diferencias significativas entre las muestras. La presencia de este compuesto para el RC fue nula en los tiempo 0, 6 y 12 horas de fermentación

Cuadro 7.2 Concentración ( $\mu\text{Mol}$ ) de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción indigestible asilada de refrigerios elaborados con subproductos de mango.<sup>1</sup>

Tiempo	Muestra					
	F1	F2	F3	RC	C+	C-
<b>3-(4-Hidroxifenil) ácido propiónico</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	20.65 $\pm$ 11.12 a A	1.7 $\pm$ 1.82 a A	5.16 $\pm$ 1.8 a A	41.71 $\pm$ 25.51 a A	40.64 $\pm$ 37.62 a A	ND
12	1.95 $\pm$ 1.2 a A	1.94 $\pm$ 1.82 a A	2.22 $\pm$ 1.83 a A	33.65 $\pm$ 29.37 b A	58.37 $\pm$ 32.43 b A	ND
24	4.06 $\pm$ 2.03 a A	1.45 $\pm$ 1.37 a A	ND	3.65 $\pm$ 3.93 a A	32.11 $\pm$ 20.9 a A	ND
48	ND	1.01 $\pm$ 1.09 a A	ND	0.96 $\pm$ 0.93 a A	35.22 $\pm$ 28.54 a A	ND
<b>3,4- ácido Dihidroxifenilacetico</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	6.47 $\pm$ 1.36 A
6	37.47 $\pm$ 12.76 b B	ND	16.18 $\pm$ 1.5 a A	ND	ND	7.05 $\pm$ 2.36 a A
12	19.06 $\pm$ 5.6 a A	20.45 $\pm$ 14.59 a A	ND	ND	ND	6.63 $\pm$ 1.63 a A
24	25.11 $\pm$ 13.09 b AB	ND	13.68 $\pm$ 5.99 ab A	ND	ND	5.69 $\pm$ 0 a A
48	ND	6.19 $\pm$ 5.52 a A	ND	ND	ND	5.69 $\pm$ 0 a A
<b>5-(3',4'-dihidroxifenil)-y-valerolactona</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	9.33 $\pm$ 9.64 a A	13.55 $\pm$ 6.34 a A	14.99 $\pm$ 9.34 a A	8.96 $\pm$ 5.36 a A	3.89 $\pm$ 2.57 a A	1.57 $\pm$ 0.78 a A
12	7.23 $\pm$ 5.06 a A	14.34 $\pm$ 13.15 a A	10.05 $\pm$ 5.83 a A	7.5 $\pm$ 3.4 a A	4.53 $\pm$ 2.23 a A	20.26 $\pm$ 2.8 a A
24	7.12 $\pm$ 3.64 a A	8.49 $\pm$ 3.26 a A	13.01 $\pm$ 8.72 a A	10.28 $\pm$ 4.79 a A	1.41 $\pm$ 0.81 a A	11.41 $\pm$ 5.49 a A
48	12.53 $\pm$ 10.94 a A	10.14 $\pm$ 5.97 a A	4.78 $\pm$ 3.46 a A	10.19 $\pm$ 1.87 a A	10.33 $\pm$ 5.93 a A	9.89 $\pm$ 5.49 a A
<b>Urolitina A / ion 227</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	1.71 $\pm$ 2.08
12	7.34 $\pm$ 1.99 a A	19.9 $\pm$ 21.47 a A	45.51 $\pm$ 9.33 b B	ND	0.57 $\pm$ 0.08 a	ND
24	4.52 $\pm$ 2.38 a A	25.41 $\pm$ 19.63 b A	8.38 $\pm$ 5.7 ab A	ND	ND	ND



<b>48</b>	7.58 ± 3.36 a A	14.06 ± 14.84 a A	9.82 ± 1.48 a A	ND	ND	ND
<b>Noratiriol</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	49.74 ± 13.13 a A	28.51 ± 6.36 a A	57 ± 16.34 a A	ND	ND	ND
<b>12</b>	129.72 ± 74.98 b B	51.47 ± 11.8 a A	17.43 ± 10.98 a A	2.59 ± 0.72 a A	ND	ND
<b>24</b>	81.82 ± 61.2 b A	34.84 ± 26.96 ab A	17.71 ± 9.95 ab A	3.86 ± 2.7 a A	ND	ND
<b>48</b>	63.24 ± 32.82 a A	14.71 ± 9.84 a A	4.85 ± 1.9 a A	ND	ND	ND
<b>Galoil-glucosa</b>						
<b>0</b>	ND	ND	7 ± 0 a A	ND	7.32 ± 0.56 a A	7 ± 0 a A
<b>6</b>	10.5 ± 1.09 a A	18.2 ± 10.01 a A	13.95 ± 3.86 a A	ND	12.55 ± 7.45 a A	11.9 ± 1.88 a A
<b>12</b>	16.33 ± 6.93 a A	ND	17.67 ± 4.76 a A	ND	13.31 ± 6.05 a A	19.77 ± 11.68 a A
<b>24</b>	10.87 ± 0.66 a A	11.38 ± 1.44 a A	12.56 ± 2.89 a A	14.24 ± 5.87 a	18.9 ± 4.07 a A	16.94 ± 5.87 a A
<b>48</b>	21.71 ± 12.67 a A	17.88 ± 8.4 a A	25.23 ± 19.73 a A	14.41 ± 1.46 a	13.74 ± 5.36 a A	15.14 ± 3.79 a A

<sup>1</sup> Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes por fila indican diferencia significativa entre los refrigerios por tiempo analizado (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05). Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencia significativa entre los tiempos de fermentación por muestra analizada (ANOVA, Tukey HSD p<0.05) Refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (70:30), F2 (70:15:15), F3 (70:7.5:22.5). Refrigerio control, RC.

Otro de los compuestos identificados mediante HPLC (Cuadro 7.4) fue Etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoico) oxibenzoato, el cual se encontró presente a partir de las 6 h de fermentación colónica observando que no existen diferencias significativas entre el tiempo de fermentación por muestra analizada ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico entre muestras por tiempo de fermentación, se observaron algunas diferencias significativas para el control negativo, siendo este quien muestra una mayor concentración con respecto a los demás refrigerios (976.06-1357.17  $\mu\text{Mol}$ ) mostrando resultados similares para la F2 a las 6 h de fermentación, para F3 y RC a las 6 y 12h. Este compuesto ha sido encontrado en frutos de mango por algunos investigadores, sin embargo, no se ha estudiado al su impacto biológico en los seres vivos (De Ancos y cols., 2013)

La dehidroximangiferina fue identificada con el ion 405 la cual se hizo presente a partir de las 6 h de fermentación para todas las formulaciones. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación por muestra ( $p > 0.05$ ). En cuanto al análisis estadístico realizado entre muestras por tiempo de fermentación se logró observar diferencias significativas para la F3 a las 48h de fermentación en donde se observó una mayor concentración de este compuesto (18.93  $\mu\text{Mol}$ ), teniendo similitud a las 48h de fermentación para la F1 con 12.5  $\mu\text{Mol}$ . Otro compuesto identificado fue la Iriflofenona-3-C-B-D-glucosido fue identificada con el ion 407, a partir de las 6h de fermentación colónica, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas durante el análisis estadístico entre tiempo de fermentación por muestra analizada, ni entre muestra por tiempo de fermentación ( $p > 0.05$ ). Los valores encontrados para este compuesto fueron entre 4 y 12  $\mu\text{Mol}$ .

Otro compuesto identificado fue la quercetina-3-O-glucósido, también conocida como isoquercetina, la cual fue encontrada con el ion 463, para este compuesto fue posible localizarlo a partir de las 6 h de fermentación colónica. No se mostraron diferencias significativas entre los refrigerios analizados por tiempo de fermentación colónica ( $p > 0.05$ ). En cambio, al analizar las muestras entre tiempos de fermentación se pudo observar una diferencia significativa durante las 48h de

fermentación para los controles positivo y negativo, siendo estas muestras quienes presentaron una mayor concentración de isoquercetina (3.27 y 5.49  $\mu\text{Mol}$ , respectivamente). Los resultados sugieren que los subproductos no incrementan la concentración de este compuesto. Se ha encontrado que este compuesto está presente en el fruto de mango el cual podría generar un efecto benéfico para la salud de quien lo consuma (Arias Gorman, 2017).

Otro compuesto identificado es la Iriflofenona-3-C-(2-O-galoil)-B-D-glucósido, la cual está presente en todas las formulaciones analizadas a partir de las 6 h de fermentación colónica y no se muestra diferencia significativa entre las muestras con respecto al tiempo de fermentación, ni entre los tiempos de fermentación por cada muestra ( $p > 0.05$ ). No hay reportes de este compuesto en la literatura.

También fue identificado el compuesto Quercetina-3-O-diglucosido con el ion 595 y la iriflofenona-3-C(2,3-di-O-Galoil)-B-D-glucósido utilizando el ion 727. Para ambos casos estos compuestos se localizaron a partir de las 6 h de fermentación colónica y fue observada en todas las formulaciones realizadas incluyendo los controles positivo y negativo, en cuanto al análisis estadístico para ambos compuestos, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación por muestras, ni para las muestras por cada tiempo de fermentación. No hay reportes de esteos compuesto en la literatura.

Cuadro 7.4 Concentración ( $\mu\text{Mol}$ ) de compuestos fenólicos identificados por HPLC-DAD-MS durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción indigestible asilada de refrigerios elaborados con subproductos de mango.<sup>1</sup>

Tiempo	Muestra					
	F1	F2	F3	RC	C+	C-
<b>Etil2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoico)oxibenzoato</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	446.93 $\pm$ 45.89 a A	640.9 $\pm$ 180.18 ab A	644.03 $\pm$ 100.58 ab A	732.91 $\pm$ 50.12 ab A	530.74 $\pm$ 25.88 ab A	976.06 $\pm$ 103.32 b A
12	540.72 $\pm$ 52.87 a A	676.44 $\pm$ 28.06 a A	775.54 $\pm$ 59.78 ab A	703.52 $\pm$ 216.49 ab A	533.97 $\pm$ 85.59 a A	1193.31 $\pm$ 87.95 b A
24	411.29 $\pm$ 303.71 a A	660.69 $\pm$ 81.76 a A	759.49 $\pm$ 60 a A	816.94 $\pm$ 212.44 a A	567.73 $\pm$ 20.23 a A	1312.99 $\pm$ 40.28 b A
48	631.65 $\pm$ 53.82 a A	724.22 $\pm$ 32.51 a A	847.1 $\pm$ 50.41 a A	635.05 $\pm$ 641.44 a A	508.05 $\pm$ 65.14 a A	1357.17 $\pm$ 106.71 b A
<b>Dehidroximangiferina</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	9.22 $\pm$ 1.46 a A	4.87 $\pm$ 2.22 a A	11.99 $\pm$ 3.37 a A	3.47 $\pm$ 1.79 a A	12.48 $\pm$ 0.21 a A	8.12 $\pm$ 3.65 a A
12	9.75 $\pm$ 7.11 a A	14.42 $\pm$ 4.05 a A	12.4 $\pm$ 1.07 a A	10.75 $\pm$ 1.74 a A	7.33 $\pm$ 5.94 a A	8.62 $\pm$ 3.6 a A
24	11.38 $\pm$ 1.57 a A	9.2 $\pm$ 6.37 a A	12.62 $\pm$ 1.65 a A	6.02 $\pm$ 7.06 a A	14.92 $\pm$ 2.85 a A	6.52 $\pm$ 3.66 a A
48	12.5 $\pm$ 2.08 ab A	9.91 $\pm$ 8.82 b A	18.93 $\pm$ 4.67 a A	6.65 $\pm$ 5.62 a A	5.44 $\pm$ 3.95 a A	16.87 $\pm$ 1.88 a A
<b>Iriflofenona-3-C-B-D-glucosido</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	4.43 $\pm$ 4.43 a A	6.21 $\pm$ 3.44 a A	2.61 $\pm$ 2.91 a A	5.3 $\pm$ 3.49 a A	11.14 $\pm$ 11.31 a A	3.49 $\pm$ 4.08 a A
12	4.92 $\pm$ 4.26 a A	9.8 $\pm$ 2.94 a A	7.78 $\pm$ 5.65 a A	8.05 $\pm$ 0.85 a A	6.78 $\pm$ 3.49 a A	9.14 $\pm$ 4.27 a A
24	7.16 $\pm$ 3.62 a A	9.43 $\pm$ 5.55 a A	8.19 $\pm$ 5.29 a A	9.35 $\pm$ 5.73 a A	9.35 $\pm$ 6.54 a A	8.08 $\pm$ 4.59 a A
48	4.37 $\pm$ 3.58 a A	5.56 $\pm$ 4.89 a A	9.77 $\pm$ 8.1 a A	9.16 $\pm$ 0.66 a A	2.86 $\pm$ 0.24 a A	10.86 $\pm$ 1.59 a A
<b>Quercetina-3-O-glucosido (isoquercetina)</b>						
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1.84 $\pm$ 1.21 a A	2.53 $\pm$ 1.58 a A	4.08 $\pm$ 1.98 a A	1.49 $\pm$ 1.22 a A	2.86 $\pm$ 1.3 a A	2.94 $\pm$ 1.46 a A
12	4.03 $\pm$ 1.21 a A	4 $\pm$ 2.45 a A	5.01 $\pm$ 1.37 a A	3.92 $\pm$ 0.44 a A	2.48 $\pm$ 1.16 a A	3.47 $\pm$ 2.26 a A
24	3.05 $\pm$ 2.15 a A	1.29 $\pm$ 0.62 a A	4.1 $\pm$ 1.11 a A	3.1 $\pm$ 1.76 a A	3 $\pm$ 1.51 a A	2.59 $\pm$ 1.07 a A
48	2.56 $\pm$ 1.28 ab A	2.33 $\pm$ 1.56 ab A	1.22 $\pm$ 0.61 a A	1.83 $\pm$ 1.53 ab A	3.27 $\pm$ 0.62 b A	5.49 $\pm$ 0.2 b A
<b>Iriflofenona-3-C-(2-O-galoil)-B-D-glucósido</b>						

<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	9.35 ± 6.9 a A	11.62 ± 4.59 a A	16.4 ± 5.93 a A	11.79 ± 3.79 a A	10.86 ± 10.51 a A	15.55 ± 1.14 a A
<b>12</b>	11.08 ± 4.77 a A	21.06 ± 5.87 a A	16.15 ± 3.95 a A	10.38 ± 4.97 a A	9.91 ± 2.97 a A	13.59 ± 9.62 a A
<b>24</b>	10.55 ± 6.1 a A	13.22 ± 5.8 a A	16.04 ± 4.69 a A	15.13 ± 4.49 a A	8.77 ± 6.51 a A	18.03 ± 3.35 a A
<b>48</b>	9.85 ± 12.01 a A	23.02 ± 6.89 a A	10.32 ± 9.59 a A	11.18 ± 4.35 a A	13.62 ± 3.21 a A	13.72 ± 4.6 a A
<b>Quercetina-3-O-diglucósido</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	2.71 ± 0.91 a A	0.99 ± 0.28 a A	2.98 ± 1.64 a A	1.24 ± 0.62 a A	0.72 ± 0.67 a A	1.02 ± 0.54 a A
<b>12</b>	2.59 ± 1.35 a A	3.37 ± 2.37 a A	1.34 ± 0.44 a A	2.53 ± 0.88 a A	0.96 ± 0.55 a A	2.99 ± 2.18 a A
<b>24</b>	0.68 ± 0.05 a A	1.34 ± 1.1 a A	1.54 ± 0.56 a A	3.29 ± 1.59 a A	3.49 ± 2.4 a A	0.94 ± 0.57 a A
<b>48</b>	2.46 ± 3.1 a A	2.17 ± 1.48 a A	2.8 ± 3.08 a A	0.68 ± 0.42 a A	2.16 ± 0.34 a A	2.15 ± 1.77 a A
<b>Iriflofenona-3-C(2,3-di-O-Galoil)-B-D-glucósido</b>						
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>6</b>	13.07 ± 4.18 a A	10.93 ± 1.73 a A	12.7 ± 3.97 a A	9.69 ± 3.32 a A	12.86 ± 3.38 a A	8.87 ± 5.81 a A
<b>12</b>	10.43 ± 1.45 a A	10.63 ± 4.18 a A	8.76 ± 5.61 a A	8.57 ± 4.55 a A	5.77 ± 3.25 a A	11.07 ± 2.93 a A
<b>24</b>	6.58 ± 2.59 a A	6.09 ± 3.16 a A	10.64 ± 2.96 a A	10.43 ± 3.28 a A	12.59 ± 1.49 a A	8.95 ± 2.55 a A
<b>48</b>	6.23 ± 4.02 a A	8.06 ± 7.56 a A	7.04 ± 4.74 a A	10.13 ± 4.2 a A	13.58 ± 0.93 a A	9.13 ± 0 a A

<sup>1</sup> Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes por fila indican diferencia significativa entre los refrigerios por tiempo analizado (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05). Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencia significativa entre los tiempos de fermentación por muestra analizada (ANOVA, Tukey HSD p<0.05) Refrigerios con subproductos de mango (pasta, cáscara, semilla): F1 (70:30), F2 (70:15:15), F3 (70:7.5:22.5). Refrigerio control, RC.

## 7.6. Inhibición enzimática a-amilasa.

La inhibición de la enzima alfa amilasa, fue realizada en los sobrenadantes de fermentación colónica a las 48 h y fueron expresadas en % de inhibición enzimática (Figura 7.9). En donde se observó que no existe diferencia significativa entre las muestras, obteniendo valores entre los 88.1457 y 99.7169%. No se encontró inhibición enzimática durante este tiempo en las muestras de fermentación de los refrigerios a base de subproductos de mango, sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que exista inhibición enzimática durante los tiempos 6, 12 y 24h de fermentación. Esto debido a la gran cantidad de polifenoles presentes en el fruto de mango ataúlfo tal como se mencionó con anterioridad. Actualmente no hay presencia de investigaciones sobre inhibición enzimática por los extractos de metabolitos generados por la microbiota colónica, sin embargo, diversos autores como Gondi y cols. (2015) menciona que dentro del intestino delgado los fitoquímicos presentes en distintas partes del fruto de mango mejoran la homeostasis de la glucosa, logrando una inhibición de la enzima alfa amilasa y alfa glucosidasa, por lo que se puede creer que los compuestos bioactivos presentes dentro de las estructuras resistentes a la digestión al llegar al colon y ser hidrolizados por la microbiota podrían crear metabolitos capaces de inhibir la actividad enzimática en el colon. Por otro lado, Wall-Medrano (2018) menciona que los polifenoles presentes en el fruto de mango ataúlfo pueden generar un efecto inhibitorio en enzimas alfa amilasa y lipasa, pudiendo generar así un alimento con efecto antidiabético y antiobesogénico. Sin embargo, también hace mención sobre la poca investigación existente de estos parámetros a nivel colónico.

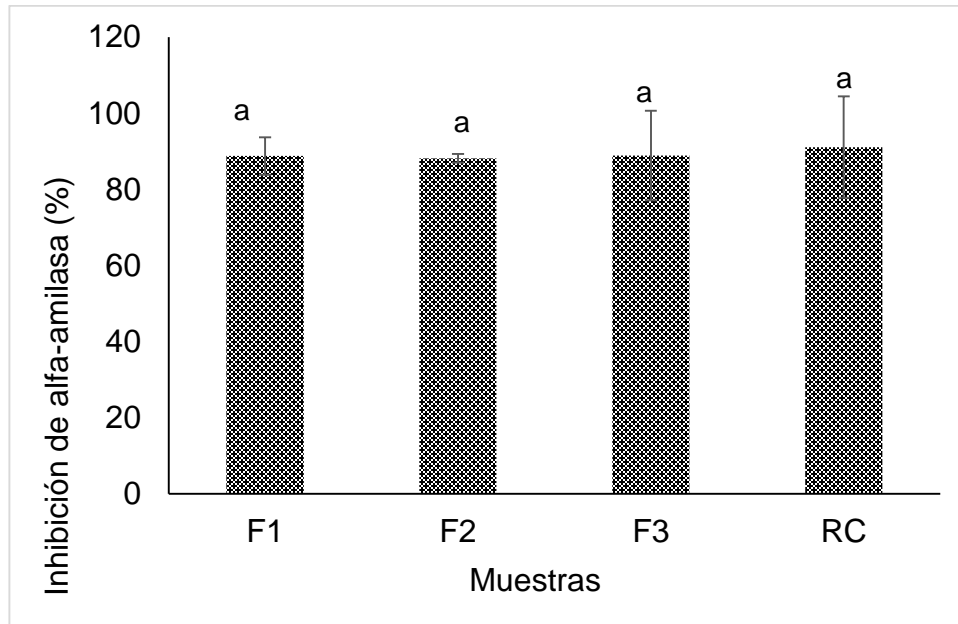


Figura 7.9 Inhibición de enzima alfa amilasa en sobrenadantes a las 48h de fermentación colónica en refrigerios elaborados con subproductos de mango (F1, F2 y F3), refrigerio control (RC)

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

La incorporación de subproductos de mango incrementa el contenido de fracción indigestible, particularmente la fracción insoluble. Las fracciones indigestibles de las formulaciones con subproductos de mango presentaron mayor contenido de fenoles solubles totales, comparado con el refrigerio control. Los subproductos de mango incrementan la cantidad de metabolitos producidos por la microbiota colónica como urolitina A y noratiriol los cuales pueden resultar en efectos potencialmente benéficos para la salud. Es importante mencionar, que los compuestos fenólicos que se encuentran en la matriz de la fracción indigestible al interactuar con la microbiota colónica pueden ser biotransformados a nuevos metabolitos. Tanto los compuestos bioactivos y sus metabolitos pueden proporcionar actividad antioxidante. Por otro lado, los SM no favorecen el crecimiento bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, sin embargo, se sugiere corroborar estos resultados con análisis moleculares. Tampoco se observó inhibición de la enzima  $\alpha$  amilasa por los extractos de fermentación colónica a las 48 horas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en los tiempos 6, 12, y 24 h pudiese generarse esta inhibición. Además, para futuros estudios es necesario evaluar concentración mínima inhibitoria de los extractos sobre estas enzimas, ya que la inhibición puede ser dependiente de la concentración. La F1 (70:30:0) obtuvo valores satisfactorios en capacidad antioxidante. Asimismo, mostró ser el refrigerio con una mayor capacidad fermentable, por lo tanto, se puede concluir que la adición de SM en un refrigerio, puede potencializar la capacidad antioxidante de los refrigerios, así como la cantidad de FST presentes, y ayuda a obtener refrigerios altamente fermentables, y con una cantidad considerable de fracción indigestible. Por lo tanto, la incorporación de harina de pasta, cáscara y semilla de mango proporciona cambios potencialmente benéficos durante la fermentación colónica de la fracción indigestible de un refrigerio tipo barra. Los efectos en la salud de los extractos de fermentación deben probarse en otros sistemas in vitro o in vivo para corroborar los resultados encontrados en esta investigación.



## CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Abedi, F., Razavi, B. M., y Hosseinzadeh, H. (2020). A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects. *Phytotherapy Research*, 34(4), 729-741.
- Álvarez-García, R. (2020). *Efecto de los polifenoles sobre la microbiota intestinal en el síndrome metabólico* Universidad de Navarra]. Pamplona, España.
- Arias Gorman, A. M. (2017). *Efecto de la aplicación de tecnologías emergentes en los atributos de calidad de productos derivados del mango y su comparación con tratamientos térmicos convencionales* Universidad Nacional del Noroeste]. Corrientes, Argentina.
- Arrazola, G., Rojano, B. A., y Díaz, A. (2013). The antioxidant capacity of five mango cultivars (*Mangifera indica* L.) and evaluation of its performance in a food matrix. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 161-172.
- Baquero, G. D. C., Paternina, G. A., y Cadavid, M. V. (2016). Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos-Tropical Fruits: Source of Natural Compounds Bioactives Food Industry. *Ingenium Revista de la facultad de ingeniería*, 17(33), 29-40.
- Barnes, R. C., Kim, H., Fang, C., Bennett, W., Nemeč, M., Sirven, M. A., Suchodolski, J. S., Deutz, N., Britton, R. A., y Mertens-Talcott, S. U. (2018). Body Mass Index as a Determinant of Systemic Exposure to Gallotannin Metabolites during 6-Week Consumption of Mango (*Mangifera indica* L.) and Modulation of Intestinal Microbiota in Lean and Obese Individuals. *Molecular nutrition & food research*, 63(2), 1800512.
- Barnes, R. C., Krenek, K. A., Meibohm, B., Mertens-Talcott, S. U., y Talcott, S. T. (2016). Urinary metabolites from mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) galloyl derivatives and in vitro hydrolysis of gallotannins in physiological conditions. *Molecular nutrition & food research*, 60(3), 542-550.
- Bazalar Palacios, J. d. R. (2018). *Evaluación de la actividad antioxidante y antihepatotóxica de la pulpa de mango (Mangifera indica L.) en ratas con*

- toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono* Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Lima, Perú.
- Benzie, I. F., y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berrio, L. F., Correa, D. A., y Ordoñez, V. M. G. (2015). Alimentos funcionales: impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. *Rev Bio Agro*, 13(2), 140-149.
- Blancas-Benitez, F. J., de Jesús Avena-Bustillos, R., Montalvo-González, E., Sáyago-Ayerdi, S. G., y McHugh, T. H. (2015). Addition of dried ‘Ataulfo’ mango (*Mangifera indica* L) by-products as a source of dietary fiber and polyphenols in starch molded mango snacks. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7393-7400.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., y Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Burton-Freeman, B. M., Sandhu, A. K., y Edirisinghe, I. (2012). El mango y sus componentes bioactivos: Agregando variedad al platillo de fruta de la salud. *mango.org*.
- Cabotaje, L., López-Guisa, J., Shinnick, F., y Marlett, J. (1990). Neutral sugar composition and gravimetric yield of plant and bacterial fractions of feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6), 1786-1792.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J., Guzman-Maldonado, S., Paredes-Lopez, O., Oomah, B., y Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food science*, 74(7), T59-T65.
- Caponi, J. F. (2018). *Empleo de enzimas en la síntesis de prebióticos* Universidad Complutense]. Madrid España.

- Capuano, E. (2017). The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3543-3564.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., y Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415-1422.
- Cavalcante, F. M. L., Almeida, I. V., Düsman, E., Mantovani, M. S., y Vicentini, V. E. P. (2018). Cytotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of the gentisic acid on HTC cells. *Drug Chemical Toxicology*, 41(2), 155-161.
- Chamorro, R. A. M., y Mamani, E. C. (2015). Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Revista de investigación en ciencia y tecnología de alimentos*, 1(1).
- Córdova-Villalobos, J. Á., Barriguete-Meléndez, J. A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., de León-May, M. E., y Aguilar-Salinas, C. A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*, 50(5), 419-427.
- Corrales Bernal, A., Urango Marchena, L. A., Rojano, B. A., y Maldonado Celis, M. E. (2014). Efectos in vitro e in vivo de la pulpa de mango (*Mangifera indica* cv. Azúcar) en la carcinogénesis de colon. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(1).
- Cruz-Trinidad, B., Sánchez-Burgos, J. A., Tovar, J., Sáyago-Ayerdi, S. G., y Zamora-Gasga, V. M. (2019). In vitro gastrointestinal digestion of mango by-product snacks: Potential absorption of polyphenols and antioxidant capacity. *International Journal of Food Science & Technology*.
- Cummings, J., y Macfarlane, G. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443-459.

- Cury, K., Aguas, Y., Martínez, A., Olivero, R., y Ch, L. C. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 122-132.
- De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Gómez, R., Colina-Coca, C., González, M., Lobo, M., y Dorta, E. (2013). Caracterización de Compuestos Fenólicos en Sub-productos de Variedades de Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivados en España Mediante HPLC-ESI-QTOF-MS. *Congreso Sociedad Agronómica de Chile, XXII Congreso Chileno de Fitopatología*, 640.
- de la Cruz, F. M. A., Aldapa, C. A. G., Rosas, J. C., y Vargas, E. R. (2018). Alimentos funcionales: Impacto en la salud. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 4(7).
- Duarte-Valenzuela, Z. N., Zamora-Gasga, V. M., Montalvo-González, E., y Sáyago-Ayerdi, S. G. (2016). Caracterización nutricional de 20 variedades mejoradas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivadas en México. *Revista fitotecnica mexicana*, 39(3), 199-206.
- Durán, R., y Valenzuela, A. (2010). La experiencia Japonesa con los alimentos FOSHU:¿ Los verdaderos alimentos funcionales? *Revista chilena de nutrición*, 37(2), 224-233.
- Elichalt, M., Russo, M., Vázquez, D., Suburú, G., Tihista, H., y Godiño, M. (2017). Lípidos, sodio y fibra dietética en harina de trigo y pan artesanal en Uruguay: aporte nutricional según recomendaciones para distintos grupos de población. *Revista chilena de nutrición*, 44(1), 71-78.
- Fernández, I. S., Cuevas, P., Angulo, J., López-Navajas, P., Canales-Mayordomo, Á., González-Corrochano, R., Lozano, R. M., Valverde, S., Jiménez-Barbero, J., y Romero, A. (2010). Gentisic acid, a compound associated with plant defense and a metabolite of aspirin, heads a new class of in vivo fibroblast growth factor inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11714-11729.
- Ferrante, D., Linetzky, B., Konfino, J., King, A., Virgolini, M., y Laspiur, S. (2011). Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2009: evolución de la epidemia

- de enfermedades crónicas no transmisibles en Argentina. Estudio de corte transversal. *Rev Argent Salud Pública*, 2(6), 34-41.
- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., y White, B. A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 121.
- Flores, J. G. P., Ordaz, J. J., y López, E. C. (2017). ¿ Qué es un alimento funcional? *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 4(8).
- Furness, J. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, 81(1-3), 87-96.
- Gondi, M., Rao, U. P. J. J. o. f. s., y technology. (2015). Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Journal of Food Science Technology*, 52(12), 7883-7893.
- González-Camaño, A., Pérez-Balmes, J., y Nieto-Sánchez, C. M. (2014). Importancia de las enfermedades crónico degenerativas dentro del panorama epidemiológico actual de México. *Salud pública de México*, 28(1), 3-13.
- Granato, D., Nunes, D. S., y Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22.
- Gray, J. (2006). Fibra dietética. Definición, análisis, fisiología y salud. *Bruselas: International Life Sciences Institute (ILSI)*, 25-33.
- Hernández-Maldonado, L. M., Blancas-Benítez, F. J., Zamora-Gasga, V. M., Cárdenas-Castro, A. P., Tovar, J., y Sáyago-Ayerdi, S. G. (2019). In Vitro Gastrointestinal Digestion and Colonic Fermentation of High Dietary Fiber and Antioxidant-Rich Mango (*Mangifera indica* L.)“Ataulfo”-Based Fruit Bars. *Nutrients*, 11(7), 1564.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Chen, P. J. J. o. a., y chemistry, f. (2010). Extraction, quantification, and antioxidant activities of phenolics from pericarp and

- seeds of bitter melons (*Momordica charantia*) harvested at three maturity stages (immature, mature, and ripe). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *58*(7), 4428-4433.
- Huazano-García, A., y López, M. G. (2013). Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faeces of mice after a supplementation of diets with agave fructans. In *Lipid metabolism*. IntechOpen.
- Humphrey, S. P., y Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*, *85*(2), 162-169.
- Jiménez-Vera, R., Monroy-Hermosillo, O., García-Garibay, M., y Corona-Cruz, A. (2006). *Modelo del colon para el estudio de probióticos y prebióticos III* Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, Guadalajara, Jalisco México.
- Jurgilevich, A., Birge, T., Kentala-Lehtonen, J., Korhonen-Kurki, K., Pietikäinen, J., Saikku, L., y Schösler, H. (2016). Transition towards circular economy in the food system. *Sustainability*, *8*(1), 69.
- Kim, S.-J., Kim, M.-C., Um, J.-Y., y Hong, S.-H. (2010). The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules*, *15*(10), 7208-7217.
- Kumar Singh, A., Cabral, C., Kumar, R., Ganguly, R., Kumar Rana, H., Gupta, A., Rosaria Lauro, M., Carbone, C., Reis, F., y Pandey, A. K. J. N. (2019). Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency. *Nutrients*, *11*(9), 2216.
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., y Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(31), 11070-11075.
- Lopez Paz, R. (2018). *Efecto de la sustitución parcial de harina de trigo (Triticum aestivum L.) por cáscara de mango (Mangifera indica L.) var. Kent en polvo sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de galletas dulces* Universidad Privada Antenor Orrego]. Trujillo, Perú.
- Lorico, A., Masturzo, P., Villa, S., Salmona, M., y Semeraro, N. (1986). Gentisic acid: an aspirin metabolite with multiple effects on human blood

- polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, 35(14), 2443-2445.
- Martínez Morales, E. S. (2016). *Calidad fenólica de los subproductos de mango* [Universidad Técnica Particular de Loja]. Loja, Ecuador.
- Mercado-Mercado, G., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., y Sáyago-Ayerdi, S. G. (2018). Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. 'Ataulfo') by-products on in vitro bioaccessibility. *Food Bioscience*, 21, 125-131.
- Mirabella, N., Castellani, V., y Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- Montero, A. V. (2019). *Revisión: Microbiota Intestinal y Obesidad*  
<https://www.sochob.cl/web1/wp-content/uploads/2019/07/MICROBIOTA-INTestinal-Y-OBESIDAD-2.pdf>.
- Muñoz-Garach, A., Diaz-Perdigones, C., y Tinahones, F. J. (2016). Microbiota y diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*, 63(10), 560-568.
- N'Goma, J.-C. B., Amara, S., Dridi, K., Jannin, V., y Carrière, F. (2012). Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Therapeutic delivery*, 3(1), 105-124.
- Ni, Y., Yang, X., Zheng, L., Wang, Z., Wu, L., Jiang, J., Yang, T., Ma, L., Fu, Z. J. M. N., y Research, F. (2019). Lactobacillus and Bifidobacterium improves physiological function and cognitive ability in aged mice by the regulation of gut microbiota. *Molecular Nutrition Food Research*, 63(22), 1900603.
- O'keefe, S. J. (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 13(12), 691.
- Okino Delgado, C. H., y Fleuri, L. F. (2016). Orange and mango by-products: Agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description—A review. *Food Reviews International*, 32(1), 1-14.
- Olempska-Bier, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., y DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144-158.

- Palafox, C., H, Yahia, E., y González-Aguilar, G. (2012). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food chemistry*, 135(1), 105-111.
- Palafox, C. H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R. R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., y González-Aguilar, G. A. (2012). Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in ‘Ataulfo’ mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*, 17(11), 12657-12664.
- Pande, S., Merker, H., Bohl, K., Reichelt, M., Schuster, S., De Figueiredo, L. F., Kaleta, C., y Kost, C. (2014). Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. *The ISME journal*, 8(5), 953.
- Prior, R. L., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Quirós-Sauceda, A. E., Chen, C.-Y. O., Blumberg, J. B., Astiazaran-Garcia, H., Wall-Medrano, A., y González-Aguilar, G. A. (2017). Processing ‘ataulfo’ mango into juice preserves the bioavailability and antioxidant capacity of its phenolic compounds. *Nutrients*, 9(10), 1082.
- Rabelo Padua, G., y Díaz Piñera, W. J. (2012). Enfermedades no transmisibles. Tendencias actuales. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 13(2), 50-54.
- Ramírez-Maganda, J., Blancas-Benítez, F. J., Zamora-Gasga, V. M., García-Magaña, M. d. L., Bello-Pérez, L. A., Tovar, J., y Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Nutritional properties and phenolic content of a bakery product substituted with a mango (*Mangifera indica*) ‘Ataulfo’ processing by-product. *Food Research International*, 73, 117-123.
- Rodríguez, G. R. V., Ordaz, R. P., y Aguilar, G. A. G. (2018). Cáscara de mango. In Fabro Editores (Ed.), *Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados*. CYTED.



- Rooks, M. G., y Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341-352.
- Sanugul, K., Akao, T., Li, Y., Kakiuchi, N., Nakamura, N., Hattori, M. J. B., y Bulletin, P. (2005). Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1672-1678.
- Sarkar, S. R., y Banerjee, S. J. J. o. n. (2019). Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroimmunology*, 328, 98-104.
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goni, I., y Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 48(8), 3342-3347.
- Saura-Calixto, F., y Goni, I. (2009). Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(2), 145-152.
- Saura-Calixto, F. D., y Goñi, I. (2004). The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *European journal of clinical nutrition*, 58(7), 1078.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Zamora-Gasga, V. M., y Venema, K. (2019). Prebiotic effect of predigested mango peel on gut microbiota assessed in a dynamic in vitro model of the human colon (TIM-2). *Food Research International*, 118, 89-95.
- Schroeder, B. O., Birchenough, G. M., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M. E., Hansson, G. C., y Bäckhed, F. (2018). Bifidobacteria or fiber protects against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell host microbe*, 23(1), 27-40. e27.
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., y Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, 69(1), 52-60.
- Sekelja, M., Berget, I., Næs, T., y Rudi, K. (2011). Unveiling an abundant core microbiota in the human adult colon by a phylogroup-independent searching approach. *The ISME journal*, 5(3), 519.

- Sharma, S., Khan, N., y Sultana, S. J. E. j. o. c. p. (2004). Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by Hibiscus rosa sinensis extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice. *European Journal of Cancer Prevention*, 13(1), 53-63.
- Souza, J. R., Trevisan, M. T. S., Feitosa, J. P., Ricardo, N. M., Hull, W. E., Erben, G., Würtele, G., Breuer, A., Frei, E., y Ulrich, C. M. (2020). Transformation of Mangiferin to Norathyriol by Human Fecal Matrix in Anaerobic Conditions: Comprehensive NMR of the Xanthone Metabolites, Antioxidant Capacity, and Comparative Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. *Natural Product Communications*, 15(3), 1934578X20910286.
- Sternini, C., Anselmi, L., y Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 15(1), 73.
- Sumaya-Martínez, M. T., Sánchez Herrera, L. M., Torres García, G., y García Paredes, D. (2012). Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 16(30).
- Tapia Santos, M., Perez Armendariz, B., Cavazos Arroyo, J., y Mayett Moreno, Y. (2013). Obtención de aceite de semilla de mango manila (*Mangifera indica* L.) como una alternativa para aprovechar subproductos agroindustriales en regiones tropicales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 32(1345-2016-104338), 258.
- Topping, D. L., y Lockett, T. J. (2016). Human Physiology and Health: Dietary Fiber, Short-Chain Fatty Acids, and Their Impact on Gut Physiology. In Elsevier Inc (Ed.), *Reference Module in Food Science*.
- Torres-León, C., Rojas, R., Contreras-Esquivel, J. C., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R. E., y Aguilar, C. N. (2016). Mango seed: functional and nutritional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 109-117.
- Velderrain-Rodríguez, G., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M. A., Ayala-Zavala, J. F., Robles-Zepeda, R. E., Wall-Medrano, A., y González-Aguilar,

- G. A. (2018). Gallic acid content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of 'Ataulfo'mango peel on LS180 cells. *Molecules*, 23(3), 695.
- Wall-Medrano, A. (2018). *Un enfoque multidisciplinario de la farmacocinética de polifenoles de mango Ataulfo: interacciones moleculares, estudios preclínicos y clínicos* (ICB Reporte técnico Issue.
- Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., y Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(3), 235-243.
- Zavala, D. F. (2019). *Obtención de un producto de confitería a base de bagazo de mango Ataulfo (Manguijera indica L.) y evaluación de su efecto prebiótico in vitro* Universidad Autónoma de Querétaro]. Santiago de Querétaro, Querétaro.