



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

INSTITUTO DE PRODUCTOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA - CSIC

Perfil metabolómico y proteómico de frutas de
procedencia agroecológica

Trabajo Fin de Máster

Máster en Seguridad y Calidad de los Alimentos

Autor: Grau Martínez, Sergio

Tutora: Alonso Lorenzo, Jana

Curso académico: 2023/2024

RESUMEN

La creciente preocupación por los efectos negativos de los fertilizantes sintéticos y pesticidas empleados en la agricultura intensiva ha llevado a explorar métodos alternativos como el cultivo agroecológico. Este tipo de manejo en campo aporta numerosos beneficios para el ecosistema, la salud humana e incluso la seguridad alimentaria. Cada vez más estudios van dirigidos a determinar si, entre estas ventajas, también se encuentran las de mejorar el perfil nutricional y el carácter organoléptico de frutas y verduras. El presente trabajo pretende implementar las técnicas Ómicas más modernas en el campo de la agronomía para determinar la capacidad antioxidante, el perfil metabolómico y el proteoma del mango (*Mangifera indica*) y la piña (*Ananas comosus*) en función de si se trata de un cultivo convencional o ecológico. Los resultados obtenidos mostraron que los mangos convencionales tenían una mayor capacidad antioxidante, mientras que, en el caso de las piñas, las muestras ecológicas fueron las que destacaron en este aspecto. El análisis metabolómico, realizado mediante espectrometría de masas, identificó diversos compuestos bioactivos como vitaminas, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. La cuantificación relativa del ácido pantoténico (vitamina B5), demostró que se encontraba en mayor concentración en las piñas ecológicas, mientras que en el mango no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. El análisis proteómico también reveló diferencias en la abundancia de proteínas: los mangos convencionales mostraron mayor intensidad en ciertas bandas proteicas, mientras que las piñas ecológicas presentaron un mayor contenido de proteínas asociadas con la bromelina. Estos resultados indican que el tipo de cultivo agrícola tiene un impacto significativo en los perfiles antioxidante, metabolómico y proteómico de mangos y piñas, por lo que este estudio destaca la importancia de continuar explorando los efectos del manejo agroecológico en la calidad nutricional y funcional de las frutas con el fin de promover prácticas agrícolas más sostenibles y beneficiosas para la salud humana y el medio ambiente.

Palabras clave: Mango, piña, capacidad antioxidante, metabolómica, proteómica, espectrometría de masas, cultivo ecológico.

ABSTRACT

The growing concern about the negative effects of synthetic fertilizers and pesticides used in intensive agriculture has led to exploring alternative methods such as agroecological cultivation. This type of crop management brings numerous benefits to the ecosystem, human health, and even food safety. Increasingly, studies aim to determine whether these advantages also include improving the nutritional status and the organoleptic properties of fruits and vegetables. This study aims to implement the most modern Omics techniques in the field of agronomy to determine the antioxidant capacity and the metabolomic and proteomic profiles of mango (*Mangifera indica*) and pineapple (*Ananas comosus*) based on whether they are grown conventionally or organically. The results showed that conventional mangoes had a higher antioxidant capacity, while, in the case of pineapples, the organic samples stood out in this aspect. The metabolomic analysis, performed by mass spectrometry, identified various bioactive compounds such as vitamins, organic acids, and phenolic compounds. The relative quantification of pantothenic acid (vitamin B5) showed higher concentrations in organic pineapples, while no significant differences were observed between the groups for mango. The proteomic analysis also revealed differences in protein abundance: conventional mangoes showed higher intensity in certain protein bands, while organic pineapples had a higher content of proteins associated with bromelain. These results indicate that the type of agricultural cultivation has a significant impact on the antioxidant, metabolomic, and proteomic profiles of mangoes and pineapples. This study highlights the importance of continuing to explore the effects of agroecological management on the nutritional and functional quality of fruits to promote more sustainable agricultural practices that are beneficial to human health and the environment.

Keywords: Mango, pineapple, antioxidant capacity, metabolomics, proteomics, mass spectrometry, organic cultivation.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 3 |
| 3.1. Materiales | 3 |
| 3.2. Determinación de la capacidad antioxidante..... | 5 |
| 3.2.1. Preparación de la muestra..... | 5 |
| 3.2.2. Fundamento del método ABTS | 5 |
| 3.3. Extracción de los metabolitos y análisis de los resultados | 6 |
| 3.4. Determinación del contenido en proteínas y extracción en gel..... | 7 |
| 3.5. Análisis Estadístico | 10 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 10 |
| 4.1. Determinación de la capacidad antioxidante..... | 10 |
| 4.2. Determinación del perfil metabólico..... | 11 |
| 4.3. Obtención de bandas de proteínas por electroforesis en gel..... | 16 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 17 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 18 |
| AGRADECIMIENTOS | 22 |
| ANEXO | 23 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tasas globales de fertilización nitrogenada ($\text{kg}\cdot\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$) en cultivo de trigo, rendimiento del grano ($\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$) y área global anual para su cultivo (10^7 ha) durante 1961-2012 ⁵ | 1 |
| Figura 2. Variación en el área (ha) dedicada a los cultivos de origen agroecológico y sus ventas en el mercado minorista en Europa entre 2012-2022..... | 2 |
| Figura 3. Protocolo preparación de la muestra para determinar su capacidad antioxidante. | 5 |
| Figura 4. Principio en el que se basa el método ABTS. | 5 |
| Figura 5. Protocolo extracción de los metabolitos y análisis de los resultados mediante software específico..... | 7 |
| Figura 6. Protocolo preparación de la muestra para determinar su contenido proteínico. | 7 |
| Figura 7. Protocolo determinación contenido en proteínas. | 8 |
| Figura 8. Protocolo separación proteínas por electroforesis en gel..... | 9 |
| Figura 9. Capacidad antioxidante de mango y piña en función del tipo de manejo en campo. .. | 10 |
| Figura 10. Cromatogramas superpuestos de las muestras de a) mango convencional, b) mango ecológico, c) piña convencional, d) piña ecológica. Muestra 1 (negro), muestra 2 (rojo), muestra 3 (azul), muestra 4 (verde). | 12 |
| Figura 11. Concentración (partes por millón) de ácido pantoténico en las distintas muestras.... | 13 |
| Figura 12. Intensidad de respuesta del detector al tiempo de retención del ácido pantoténico en: a) todo el ensayo, b) muestras de mango y c) muestras de piña..... | 15 |
| Figura 13. Gel de electroforesis de proteínas en mango y piña..... | 16 |
| | |
| Figura A1. Rectas patrón de a) Tiamina, b) Riboflavina, c) Ácido pantoténico, d) Ácido clorogénico, e) Lupeol beta viscol | 23 |
| Figura A2. Cromatogramas de a) Tiamina, b) Riboflavina, c) Ácido pantoténico, d) Ácido clorogénico, e) Lupeol beta viscol. | 24 |
| Figura A3. Perfiles de fragmentación de a) Tiamina, b) Riboflavina, c) Ácido pantoténico, d) Ácido clorogénico, e) Lupeol beta viscol..... | 25 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Procedencia de las frutas ensayadas. | 3 |
| Tabla 2. Sumario de los reactivos empleados..... | 4 |
| Tabla 3. Condiciones cromatográficas empleadas para la identificación de los metabolitos. | 6 |
| Tabla 3. Capacidad antioxidante de las frutas medido en micromoles de TROLOX por gramo de muestra liofilizada. | 11 |
| Tabla 4. Metabolitos identificados por el software UNIFI. | 13 |
| Tabla 5. Intensidad de respuesta al tiempo de retención del ácido pantoténico. | 15 |

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la agricultura mundial ha logrado un impulso significativo gracias, entre otros factores, al empleo de fertilizantes sintéticos y pesticidas. No obstante, este incremento de la producción agrícola también conlleva importantes perjuicios sobre la población y el entorno. La “Revolución Verde” fue un hito histórico ocurrido entre 1940 y 1970 que se caracterizó por aumentar el rendimiento de los cultivos, mejorar los sistemas de riego y transferir los conocimientos y la tecnología más vanguardista al campo ¹. Sin embargo, el cultivo intensivo derivado de este acontecimiento mundial ha supuesto un uso desmedido de sustancias que promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos y de compuestos de prevención y/o control de plagas.

Los problemas derivados del uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas en la agricultura son numerosos y cada vez más acusados. En el caso de los fertilizantes, la cantidad ingente de nitrógeno añadido a los cultivos con el objetivo de aumentar ligeramente su rendimiento (**Figura 1**) produce la degradación de los suelos, el desbalance de sus nutrientes y la eutrofización de las aguas ²⁻⁴.

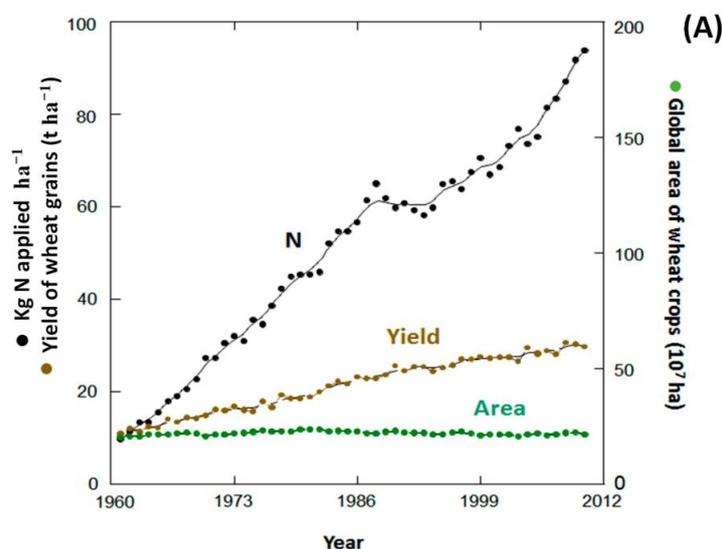


Figura 1. Tasas globales de fertilización nitrogenada ($\text{kg-N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$) en cultivo de trigo, rendimiento del grano ($\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$) y área global anual para su cultivo (10^7 ha) durante 1961-2012 ⁵.

Por otro lado, el uso de pesticidas en el campo se relaciona con la pérdida de la biodiversidad de los ecosistemas, una calidad de los suelos deficiente y supone una amenaza para la salud humana por contacto directo durante la actividad agrícola ^{6,7}. También se han reportado importantes consecuencias negativas sobre la seguridad alimentaria y las aguas de consumo. Los pesticidas pueden afectar al ser humano indirectamente al encontrarse en los alimentos y en diversos cultivos. Cabe señalar que, en algunos casos, estos residuos han excedido los estándares máximos de contaminación establecidos por la OMS ⁸. Según Popp *et al.* ⁹, esta problemática es especialmente prevalente en frutas y verduras, donde los residuos pueden ser difíciles de eliminar incluso mediante el lavado.

Con todo ello, la necesidad de adoptar prácticas más sostenibles ha llevado a la exploración de métodos alternativos en la agricultura, dentro de los cuales encontramos el cultivo

agroecológico. Como se puede apreciar en la **Figura 2**, las ventas de alimentos orgánicos y la superficie terrestre dedicada a su cultivo ha aumentado de manera acusada en los últimos años ¹⁰.

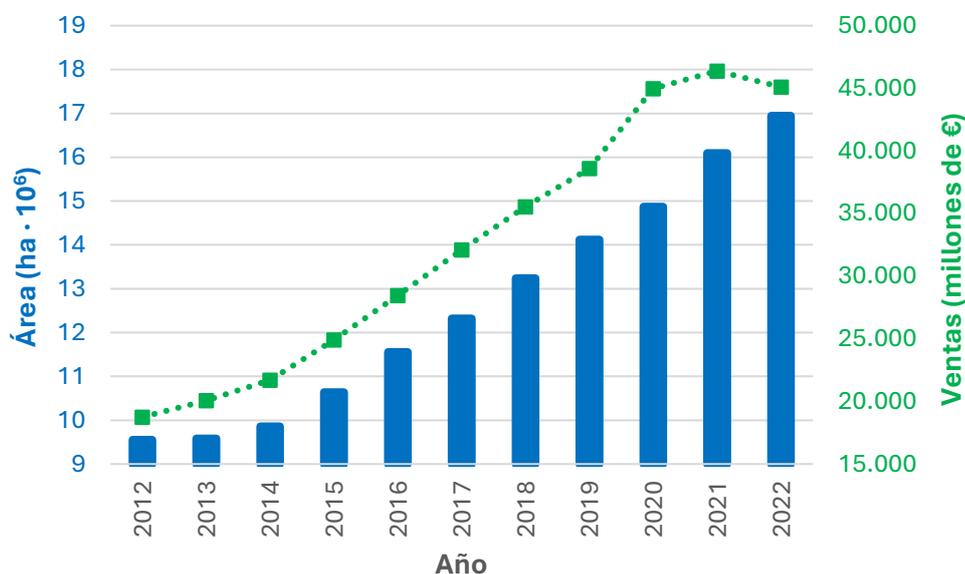


Figura 2. Variación en el área (ha) dedicada a los cultivos de origen agroecológico y sus ventas en el mercado minorista en Europa entre 2012-2022. Elaboración propia. Fuente: FiBL Statistics.

Si bien es cierto que esta técnica de cultivo recibe críticas por tener un rendimiento productivo menor (entre un 8%-25% inferior al cultivo convencional) ¹¹, sus beneficios van más allá de la producción en campo: (1) conservar la biodiversidad creando un entorno más favorable para diversas especies ¹², (2) aumentar la calidad y fertilidad del suelo, (3) gestionar eficazmente los recursos naturales ¹³ y, en última instancia, (4) mejorar la seguridad alimentaria al eliminar los residuos de herbicidas, insecticidas y fertilizantes sintéticos ¹⁴. En el cultivo ecológico estos compuestos son sustituidos por un fuerte vínculo entre plantas, insectos y comunidades microbianas del suelo que, en su conjunto, previenen la aparición de plagas y protegen a los cultivos de estas ¹⁵.

El empleo de un método de cultivo agroecológico no solo tiene implicaciones en la inocuidad de las frutas y verduras que comemos, sino que también se han observado diferencias en su perfil de macronutrientes y micronutrientes. Según Raigón *et al.* ¹⁶, en el caso de las berenjenas (*Solanum melongena*) de procedencia ecológica, estas presentaron un mayor contenido fenólico total y de diversos minerales. En el caso del pimiento (*Capsicum* spp.), también se han observado resultados en la misma línea: las muestras orgánicas tenían mayores niveles de ácido ascórbico, fenoles totales, flavonoides totales y luteolina ^{17,18}.

El mango (*Mangifera indica*) y la piña (*Ananas comosus*) son dos frutas tropicales de gran importancia en el mercado mundial y presentan ciertas similitudes: ambas requieren climas cálidos con una alta exposición al sol y tienen un ciclo de crecimiento largo hasta su desarrollo completo. En cuanto a su manejo en campo, son susceptibles a una variedad de plagas y enfermedades, por lo que fertilizantes y pesticidas son ampliamente utilizados durante su cultivo. Sin embargo, el cultivo ecológico de mango y piña ha ganado terreno debido a la creciente preocupación por la sostenibilidad y la salud. Pese a la importancia mundial de estas dos frutas,

existen muy pocos estudios que hayan analizado las posibles diferencias en el perfil nutricional entre muestras ecológicas y de manejo convencional por lo que no se han podido determinar si existen tales, y en tal caso, si van en concordancia con los resultados para otros cultivos.

En las últimas décadas, el avance de la tecnología ha permitido el desarrollo de diversas técnicas Ómicas que han revolucionado la investigación científica. Entre estas técnicas destacan la metabolómica y la proteómica. La metabolómica se refiere al análisis sistemático y cuantitativo de los metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo ¹⁹. Por su parte, la proteómica es un conjunto de tecnologías que se utilizan para identificar proteínas y mapear sus interacciones en un contexto celular ²⁰. Históricamente, estas técnicas han sido aplicadas principalmente en campos como la medicina, la biología molecular y la farmacología.

No obstante, la aplicación de la metabolómica y la proteómica en el estudio de las frutas, como pueden ser el mango y la piña, es un campo emergente. Es en este contexto donde se abre un horizonte por descubrir. La caracterización del perfil metabolómico y proteómico de estos alimentos puede revelar información clave acerca de la repercusión que tiene el tipo de manejo en campo sobre la materia prima final.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue determinar los diversos compuestos presentes en la pulpa de mango y piña y comparar los resultados obtenidos para cada fruta en función del tipo de manejo en campo: convencional o agroecológico.

Para lograr este objetivo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la capacidad antioxidante de las distintas frutas.
- Analizar el perfil metabolómico de las frutas: extracción de los metabolitos de la pulpa e identificarlos por espectrometría de masas (uHPLC-MS).
- Describir el perfil proteómico de las frutas: extracción proteica de la pulpa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Los ensayos se realizaron a partir de 8 piñas y 8 mangos (4 ecológicos y 4 convencionales, respectivamente) y las muestras fueron previamente liofilizadas (LYOMICRON Coolvacuum Technologies). La procedencia de las frutas se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Procedencia de las frutas ensayadas.

| | Procedencia | |
|---|----------------------|-----------------------|
| | Convencional | Ecológico |
| Mango <i>Mangifera indica</i> 'Osteen' | Güímar (Tenerife) | Puntallana (La Palma) |
| Piña <i>Ananas comosus</i> 'MD2' | Frontera (El Hierro) | Mazo (La Palma) |

Los reactivos utilizados para los distintos ensayos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Sumario de los reactivos empleados.

| Ensayo capacidad antioxidante | |
|--|------------------------|
| Reactivo | Marca Comercial |
| TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) | Sigma-Aldrich |
| ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) | Sigma-Aldrich |
| Ensayo extracción metabolitos | |
| Reactivo | Marca Comercial |
| MTBE (Metil terbutil éter) | MERCK |
| Ensayo extracción proteínas | |
| Reactivo | Marca Comercial |
| 0,5 EDTA solution (100X) (Ethylenediaminetetraacetic acid) | Thermo Scientific |
| Cocktail Protease & Phosphatase Inhibitor (100X) | Thermo Scientific |
| DTT (DL-Dithiothreitol) | Sigma-Aldrich |
| LDS Sample Buffer (4X) | Life Technologies |
| Sample Reducing Agent (10X) | Life Technologies |
| MES SDS Running Buffer (20X) | Life Technologies |
| Coomassie Brilliant blue | Expedeon |
| Sucrose | MERCK |
| Protein Assay | BIO-RAD |
| Tris-HCl (Tris-Hydrochloride) | Sigma-Aldrich |
| KCl | Sigma-Aldrich |
| Albúmina de suero bovina (ASB) | Sigma-Aldrich |

3.2. Determinación de la capacidad antioxidante

3.2.1. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra previa al ensayo aparece en la **Figura 3**. Este protocolo fue una versión modificada de Gillespie et al., 2007. El equipo utilizado para la homogeneización fue Polytron PT 2500 E y la centrifuga Mega Star 3.0R (VWR). La absorbancia se midió con el equipo BioChrom Libra S22.

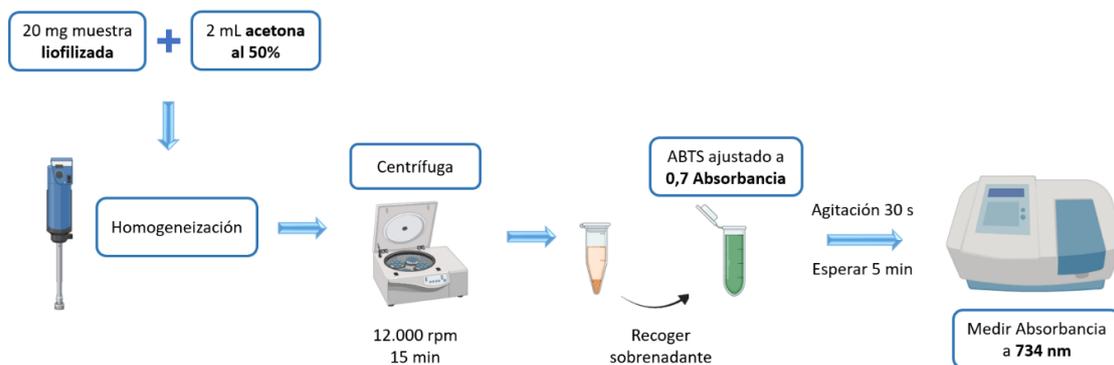


Figura 3. Protocolo preparación de la muestra para determinar su capacidad antioxidante.
Elaboración propia.

3.2.2. Fundamento del método ABTS

El fundamento en el que se basa esta técnica se muestra en la **Figura 4**. Se realizó una curva patrón con 7 patrones de **TROLOX** a distintas concentraciones (20, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ Molar). La capacidad antioxidante de las distintas frutas se cuantificó como micromoles de TROLOX por gramo de muestra liofilizada.

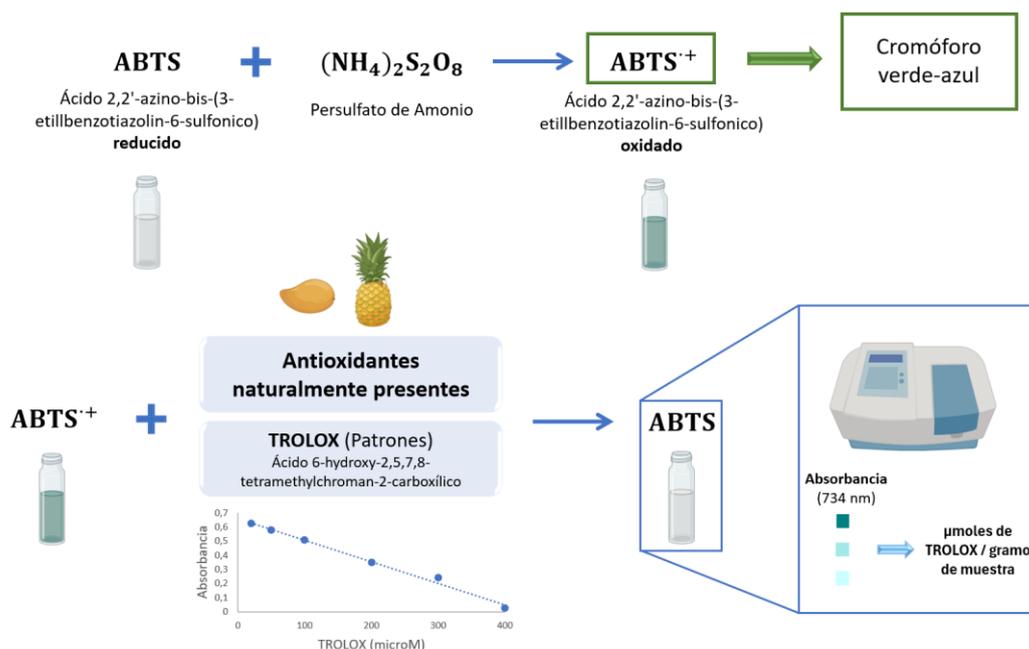


Figura 4. Principio en el que se basa el método ABTS.
Elaboración propia.

3.3. Extracción de los metabolitos y análisis de los resultados

El protocolo seguido para extraer los metabolitos de la matriz de las frutas se muestra en la **Figura 5** y es una adaptación del empleado por Salem *et al.* ²². Las muestras fueron analizadas por el equipo Vion IMS QToF (Waters, RU) y las condiciones cromatográficas se indican en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas empleadas para la identificación de los metabolitos.

| | | | |
|---|--|-------------|------------|
| Columna | ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 µm 50°C | | |
| Autosampler | Volumen inyección | 2 µL | |
| | Temperatura | 10 °C | |
| Bomba cuaternaria | Caudal | 0,5 mL/min | |
| | Disolvente A: Acetonitrilo + 0,1% ácido fórmico Disolvente B: Agua + 0,1% ácido fórmico | | |
| | Tiempo (min) | % A | % B |
| | 0,0 | 2 | 98 |
| | 1,0 | 2 | 98 |
| | 12,0 | 98 | 2 |
| | 15,0 | 100 | 0 |
| | 15,1 | 2 | 98 |
| 17,0 | 2 | 98 | |
| Espectrómetro de masas Vion IMS QToF | Polaridad | Positiva | |
| | Tipo de fuente | ESI | |
| | Rango de masa | 50-2000 m/z | |
| | Energía de colisión | 10-50V | |

La búsqueda de metabolitos de interés en mango y piña se realizó sobre librerías generadas específicamente para los compuestos contenidos en cada tipo de fruta. Se utilizó el software específico UNIFI (Waters, RU).

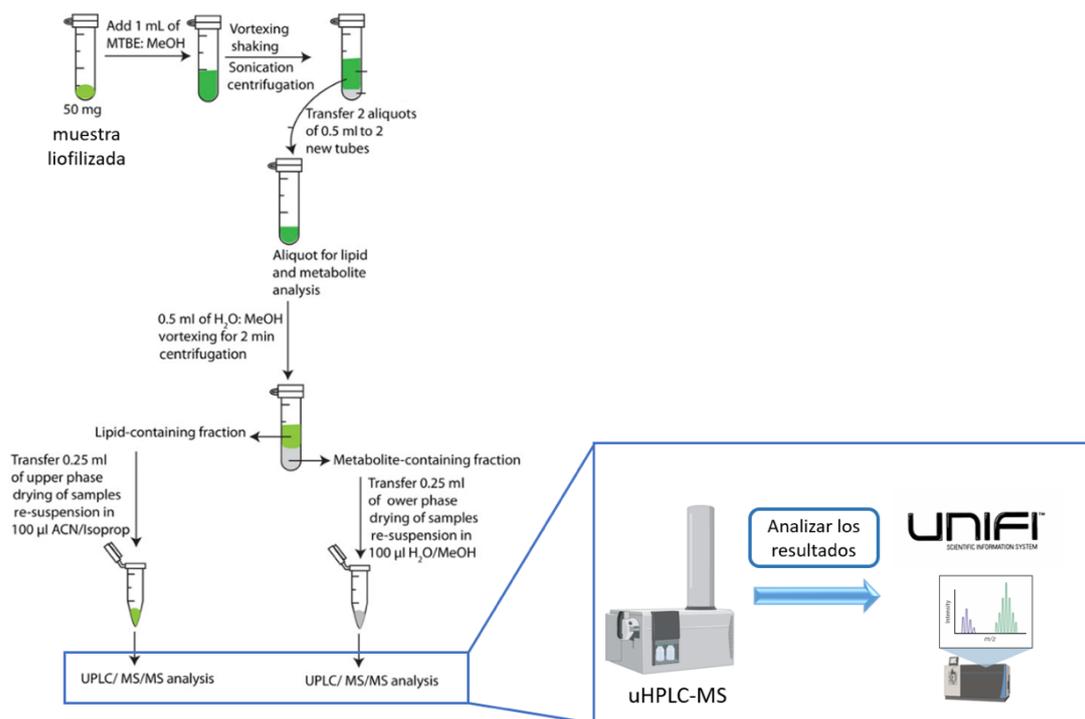


Figura 5. Protocolo extracción de los metabolitos y análisis de los resultados mediante software específico. Elaboración propia.

3.4. Determinación del contenido en proteínas y extracción en gel

El protocolo para la preparación de la muestra se desarrolla en la **Figura 6**.

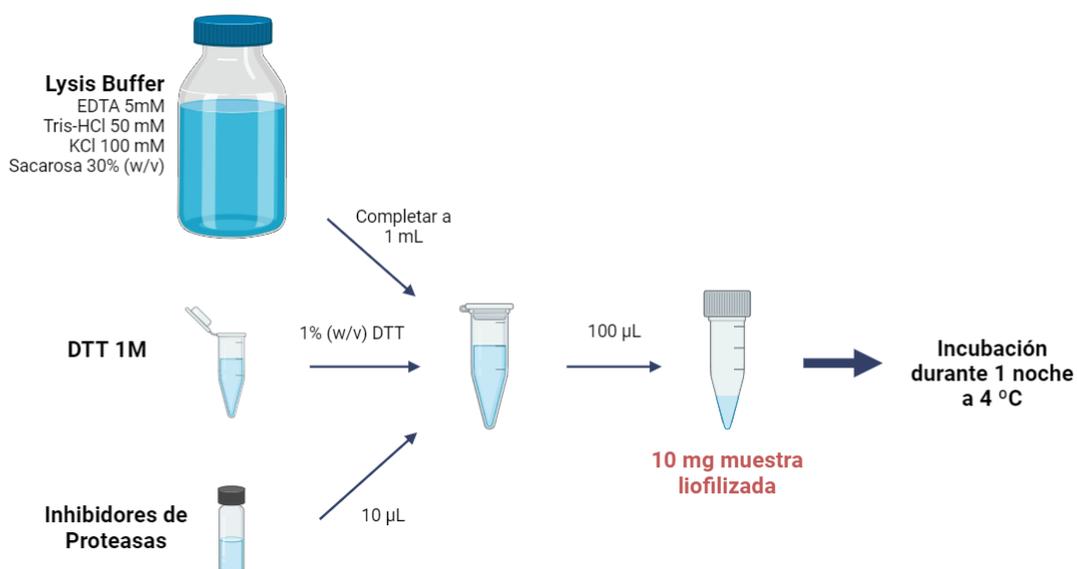


Figura 6. Protocolo preparación de la muestra para determinar su contenido proteínico. Elaboración propia.

La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método Bradford ²³ tal y como se indica en la **Figura 7**. Se realizó una curva patrón con 5 patrones de ASB a distintas concentraciones (1; 2; 2,5; 5; 7,5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

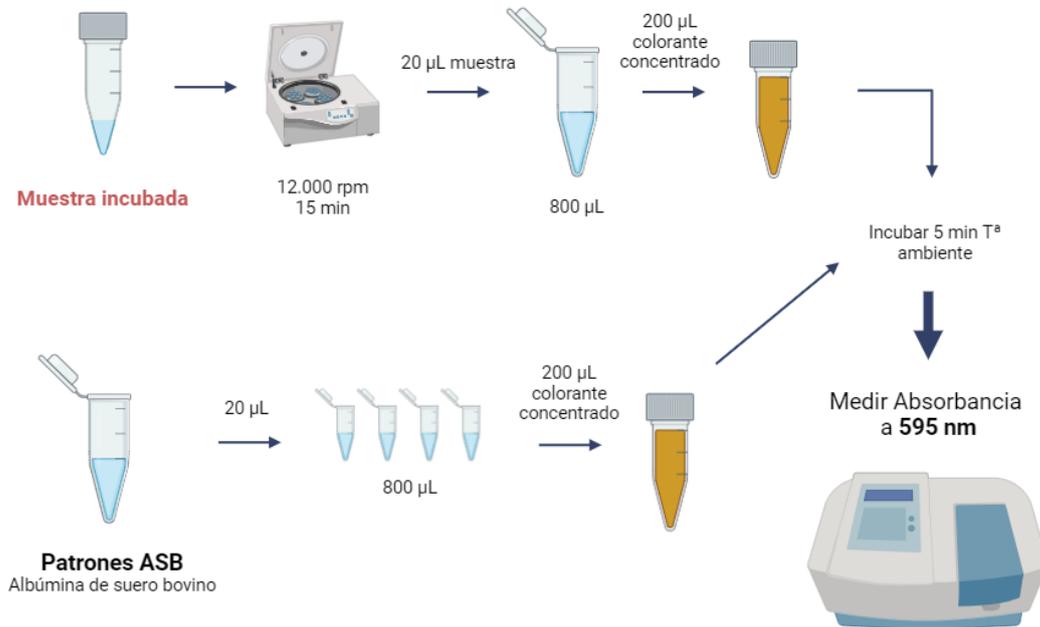


Figura 7. Protocolo determinación contenido en proteínas.
Elaboración propia.

En la etapa de la electroforesis en gel SDS-PAGE se analizaron 6 μg de proteína por muestra y la separación se hizo a voltaje constante de 150V durante 1h y 30 min. La visualización de proteínas se realizó mediante tinción con azul de Coomassie, manteniendo los gels resultantes en agitación durante la noche (**Figura 8**).

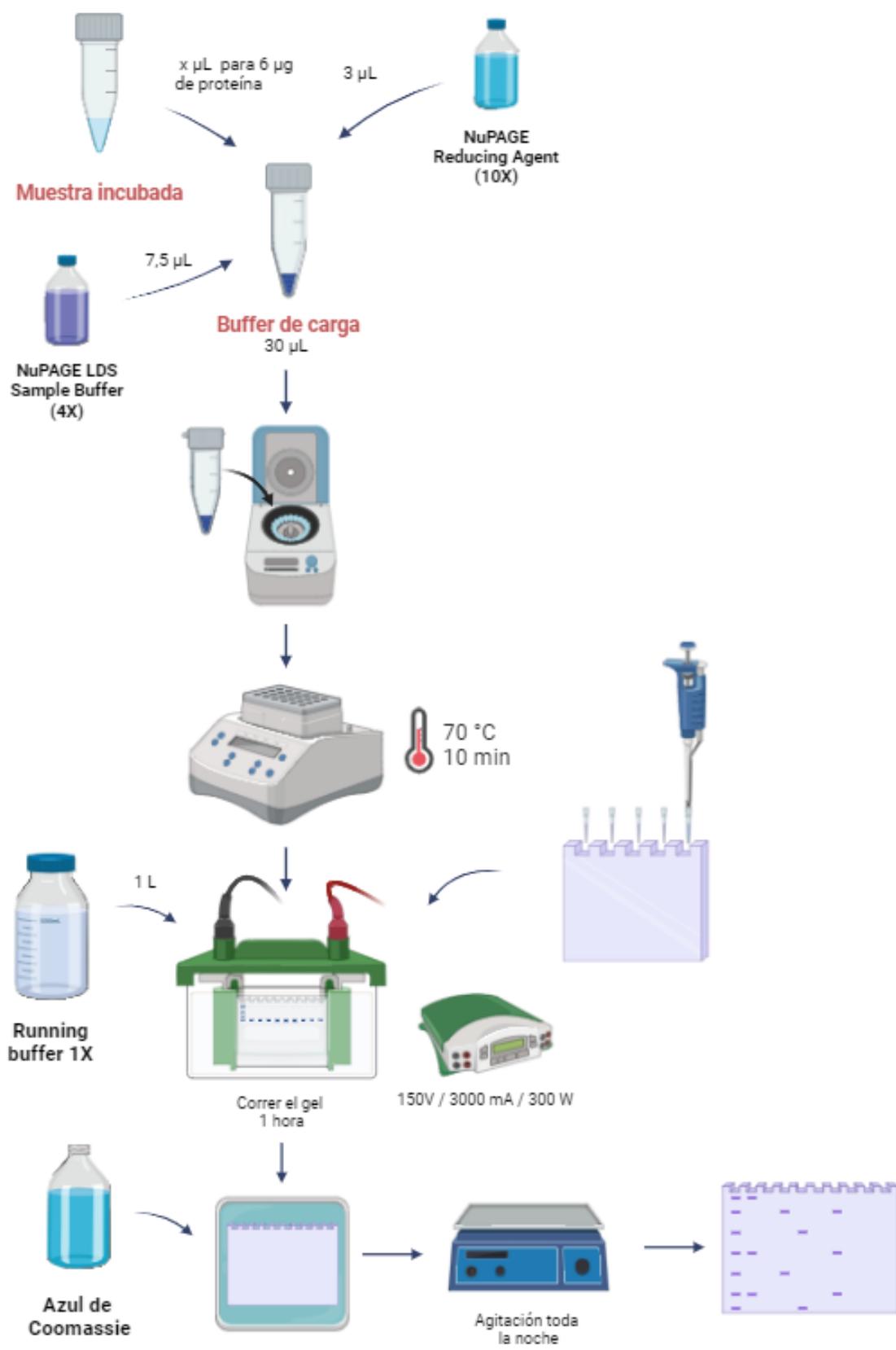


Figura 8. Protocolo separación proteínas por electroforesis en gel. Elaboración propia.

3.5. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Los resultados obtenidos se analizaron mediante prueba t de Student, Mann-Whitney U o t de Welch, según correspondió en cada caso, a un nivel de significación $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos muestran importantes diferencias para un mismo tipo de fruta en función del manejo en campo (**Figura 9** y **Tabla 3**).

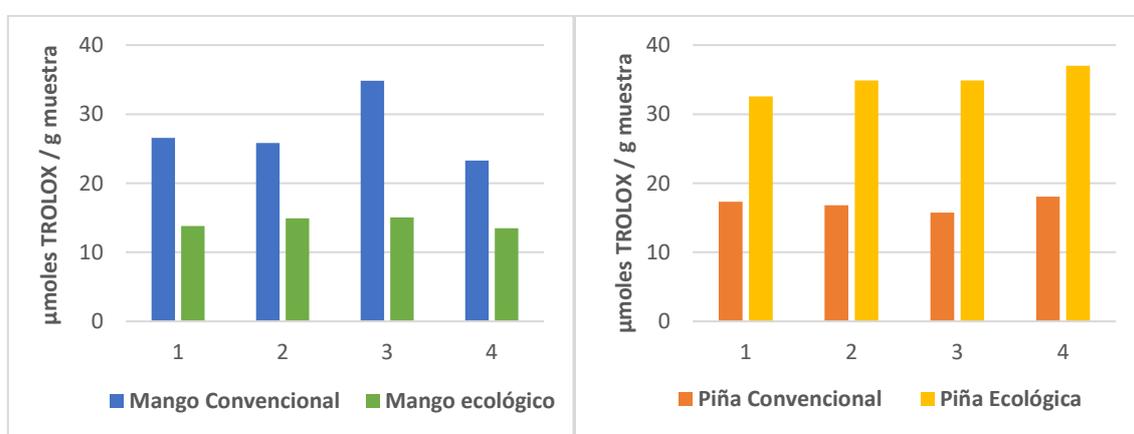


Figura 9. Capacidad antioxidante de mango (izquierda) y piña (derecha) en función del tipo de manejo en campo medido en micromoles de TROLOX por gramo de muestra liofilizada.

Como podemos observar, en el caso del mango la capacidad antioxidante es significativamente mayor en todas las muestras de cultivo convencional frente a las de origen ecológico. Estos resultados concuerdan con otros autores, quienes señalan un poder antioxidante hasta un 22% superior en las muestras del primer grupo ²⁴. En cambio, estudios sobre diferentes variedades de mango han identificado a la de origen agroecológico como la de mayor capacidad antioxidante frente a otras 3 variedades cultivadas empleando pesticidas ²⁵, o bien identifican a los mangos ecológicos inmaduros como los de mayor contenido antioxidante ²⁶.

Tabla 3. Capacidad antioxidante de las frutas medido en micromoles de TROLOX por gramo de muestra liofilizada. Un p -valor $<0,05$ indica diferencias estadísticamente significativas entre distintos tipos de manejo en campo para una misma fruta.

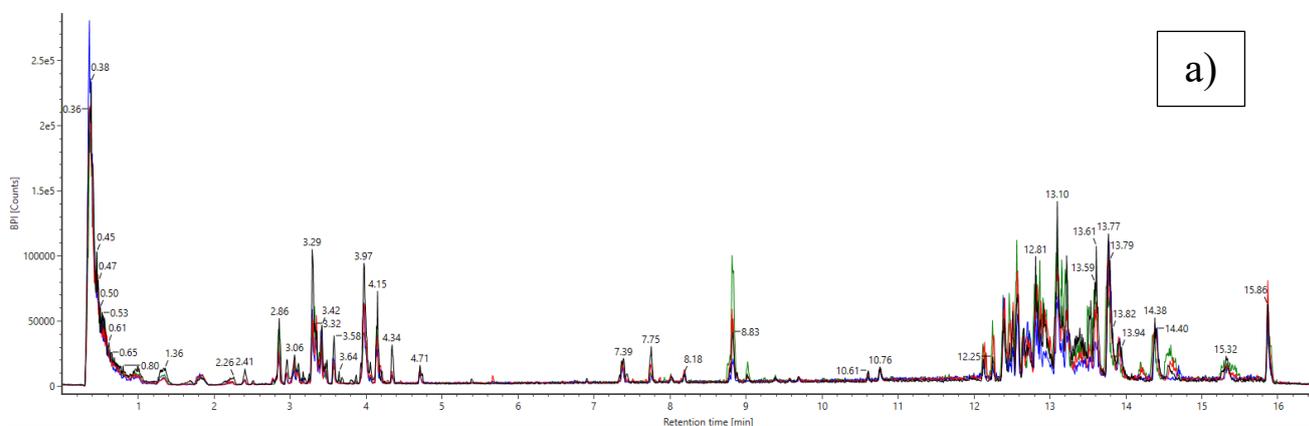
| | $\mu\text{moles TROLOX / g muestra liofilizada}$ | p -valor |
|---------------------------|--|----------------------|
| Mango convencional | 28 ± 5 | $1,96 \cdot 10^{-3}$ |
| Mango ecológico | 17 ± 1 | |
| Piña convencional | $14,3 \pm 0,8$ | $2,14 \cdot 10^{-7}$ |
| Piña ecológica | $34,8 \pm 1,8$ | |

El ensayo con la piña muestra resultados opuestos ya que las muestras ecológicas presentan un poder antioxidante mucho mayor al de las muestras de cultivo convencional. No obstante, Ngereza A.J. & Pawelzik E. ²⁴ no observó diferencias significativas para una misma variedad de piña cultivada mediante ambos métodos.

Numerosos autores son los que han estudiado la capacidad antioxidante de diversas frutas en función del tipo de manejo en campo. Mientras que unos no han identificado diferencias significativas entre ambos grupos ²⁷, otros muchos sí sugieren niveles más altos de antioxidantes y vitaminas en aquellas producidas ecológicamente ²⁸⁻³⁰. La disparidad en los resultados obtenidos puede deberse a las diferentes variedades empleadas, distinto grado de maduración, diversas condiciones ambientales, el tipo de manejo postcosecha o bien las diferencias en cuanto al método de análisis, ya que en este estudio se utilizó el método ABTS para medir la capacidad antioxidante, pero existen diferentes métodos (DPPH, FRAP, etc.) que pueden producir resultados variables.

4.2. Determinación del perfil metabólico

La obtención de unos cromatogramas con numerosos picos separados entre ellos demuestra que el método de extracción empleado fue el adecuado y las condiciones cromatográficas las óptimas (**Figura 10**, páginas 11 y 12).



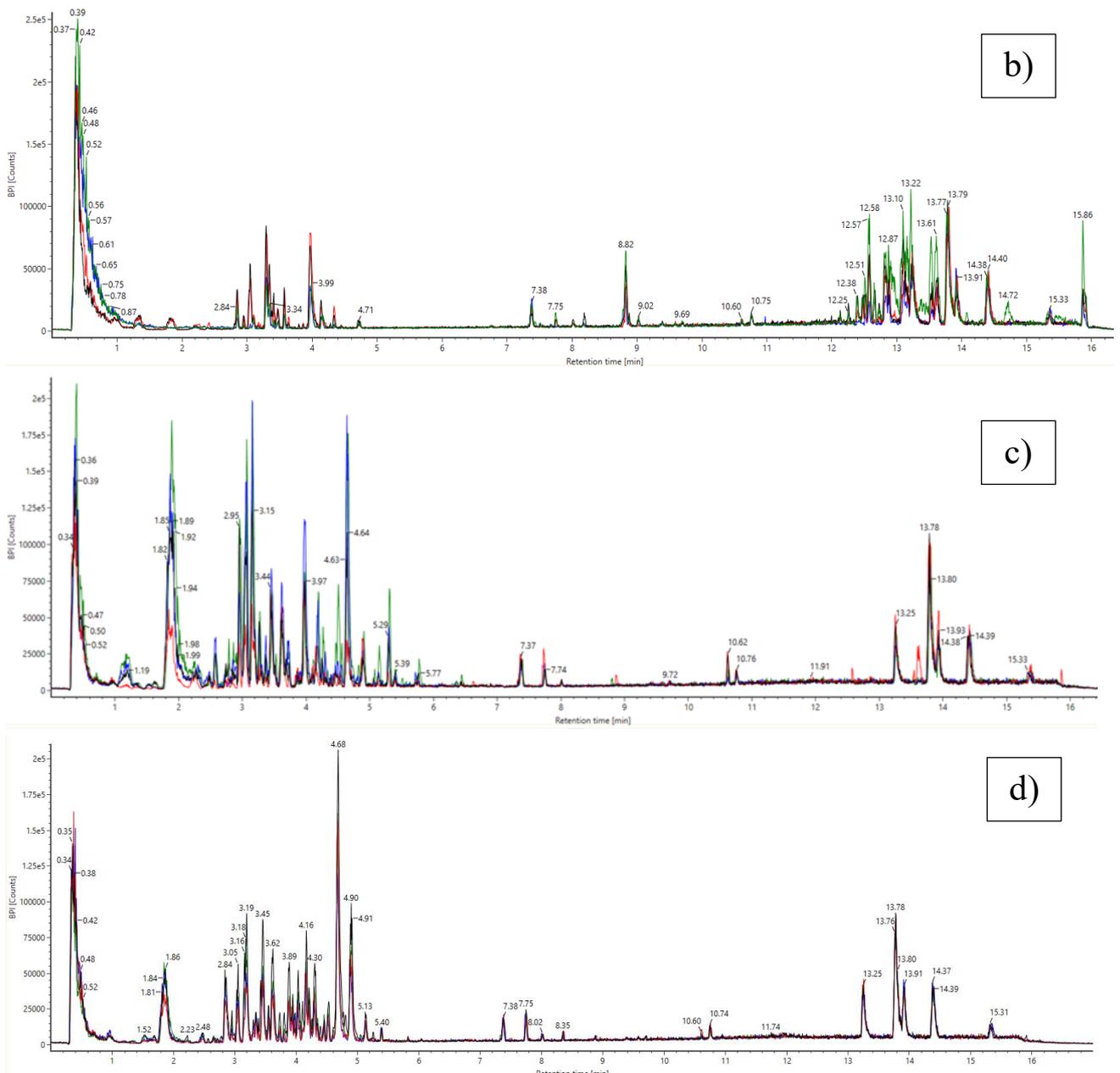


Figura 10. Cromatogramas superpuestos de las muestras de a) mango convencional, b) mango ecológico, c) piña convencional, d) piña ecológica. Muestra 1 (negro), muestra 2 (rojo), muestra 3 (azul), muestra 4 (verde).

A partir de los espectros de fragmentación obtenidos para cada tiempo de retención, UNIFI realizó una identificación estimada de aquellos metabolitos presentes en las muestras mediante la comparación del espectro de masas registrado en cada pico cromatográfico con los espectros de masas de la base de datos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Metabolitos identificados por el software UNIFI.

| Metabolitos en mango | Metabolitos en piña | Metabolitos en ambas frutas |
|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| Lupeol Beta Viscol | Ácido shikímico | Tiamina (vit. B1) |
| Mangiferina | | Riboflavina (vit. B2) |
| Fenilpropil acetato | | Niacina (vit. B3) |
| Indol | | Ácido pantoténico (vit. B5) |
| Benzofenona | | Piridoxina (vit. B6) |
| Ácido clorogénico | | Ácido cítrico |
| Ácido sinapínico | | Ácido ascórbico (vit. C) |

Con el objetivo de confirmar y cuantificar los compuestos identificados anteriormente, se prepararon patrones a distintas concentraciones (0,2; 1 y 5 ppm) para determinar su tiempo de retención y perfil de fragmentación (**Anexo Figura A1, Figura A2 y Figura A3**).

Posteriormente se realizó la cuantificación del ácido pantoténico porque fue el único metabolito que se consiguió identificar en todas las muestras (**Figura 11**). Mientras que en unas muestras se pudo determinar la concentración de esta vitamina, en otras su contenido se encontraba por debajo del patrón más diluido, por lo que no se pudo cuantificar.

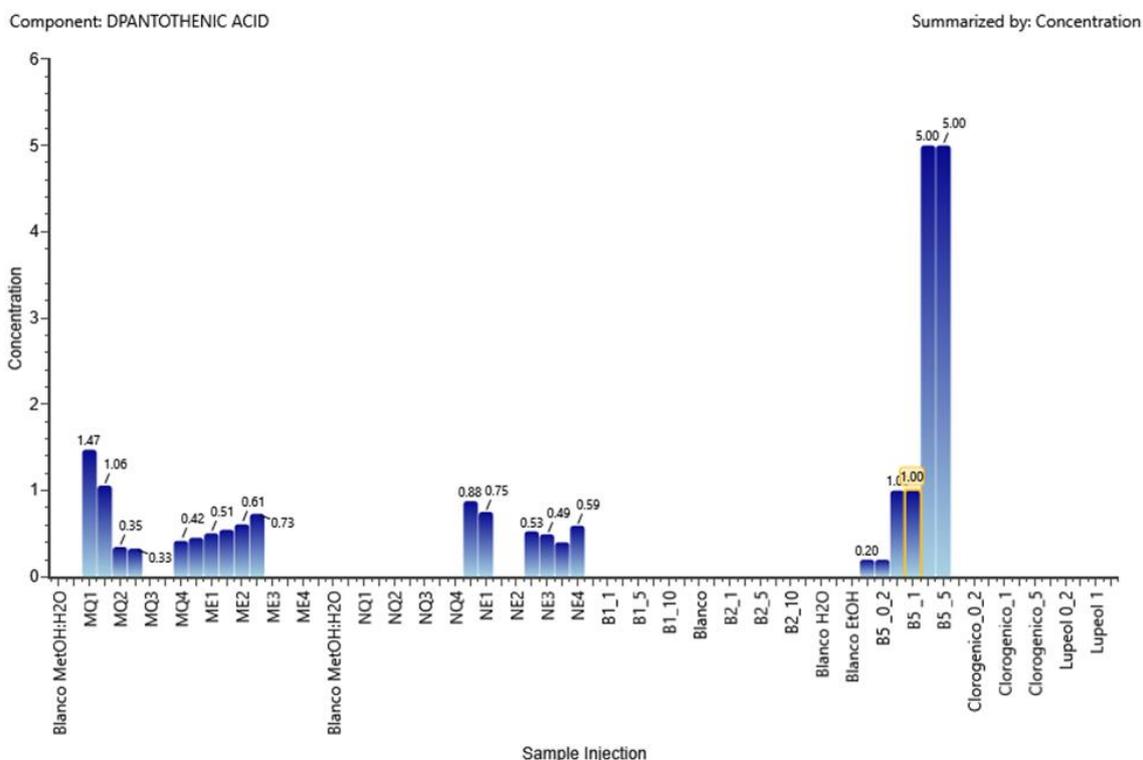
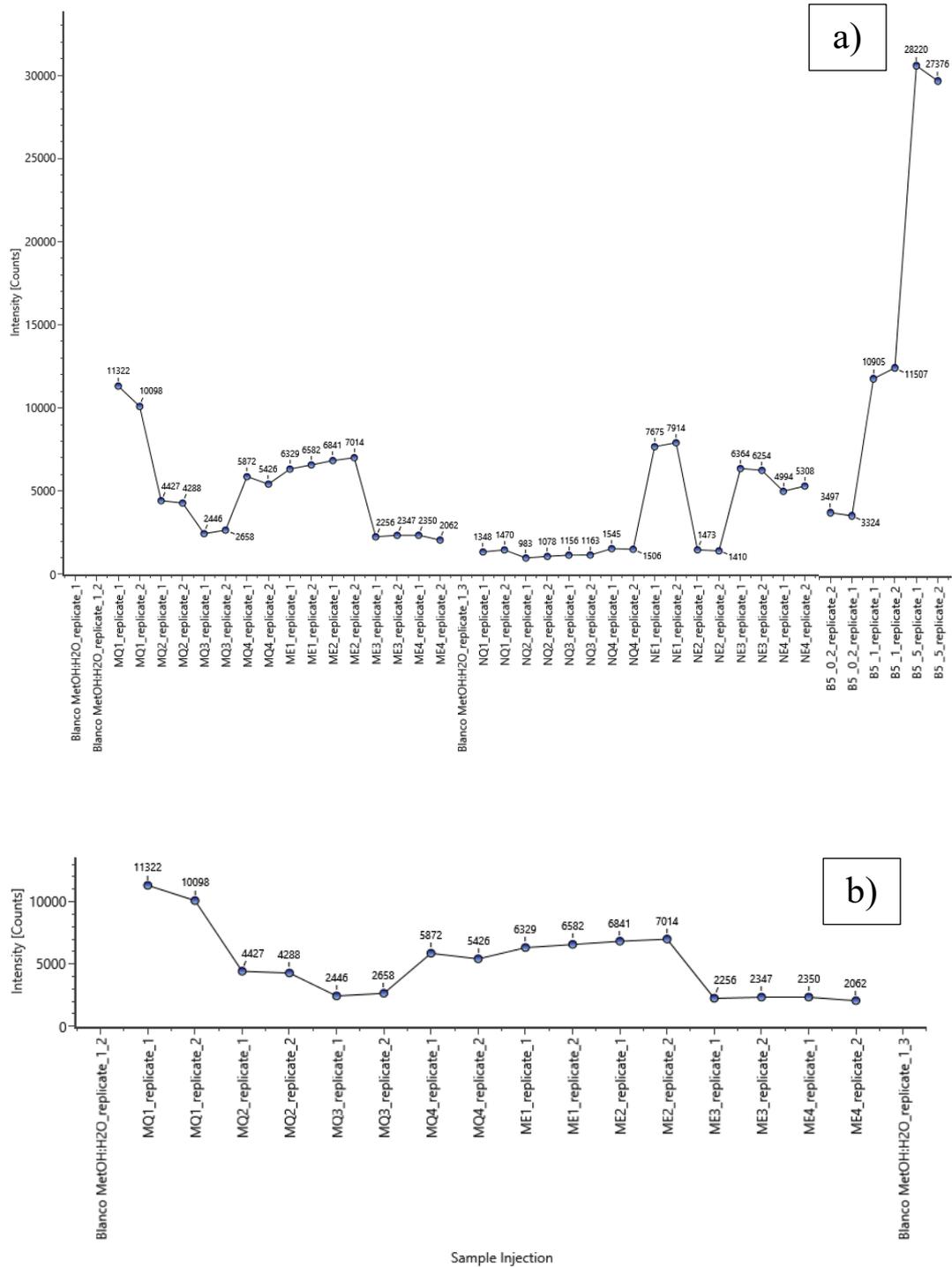


Figura 11. Concentración (ppm, partes por millón) de ácido pantoténico en las distintas muestras.

Sin embargo, basándose en la intensidad de respuesta del detector al tiempo de retención del ácido pantotámico se pudo determinar cómo, en mayor o menor medida, el compuesto estaba presente (**Figura 12**, págs. 14 y 15).



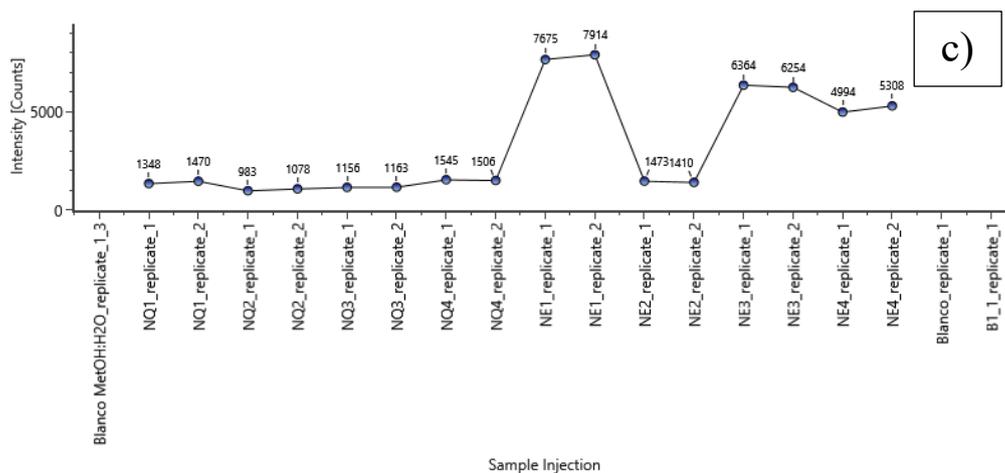


Figura 12. Intensidad de respuesta del detector al tiempo de retención del ácido pantoténico en: a) todo el ensayo, b) muestras de mango y c) muestras de piña.

Con estos datos realizamos una cuantificación relativa para determinar si existían diferencias significativas en cuanto al contenido de vitamina B5 en función del tipo de cultivo (**Tabla 5**).

Tabla 5. Intensidad de respuesta al tiempo de retención del ácido pantoténico. Un p -valor $< 0,05$ indica diferencias estadísticamente significativas entre distintos tipos de manejo en campo para una misma fruta.

| | Intensidad de respuesta al t_r del ácido pantoténico | p -valor |
|---------------------------|--|------------|
| Mango convencional | 5817 ± 3260 | 0,4418 |
| Mango ecológico | 4473 ± 2382 | |
| Piña convencional | 1281 ± 214 | 0,0032 |
| Piña ecológica | 5174 ± 2515 | |

Como se puede observar, si bien en el mango no existen diferencias en cuanto al contenido de vitamina B5 entre ambos grupos, las muestras de piña ecológica sí presentan mayor contenido en este compuesto en comparación con las frutas de origen convencional.

Ambas frutas contienen una cantidad moderada de esta vitamina en comparación con otras vitaminas del grupo B: 0,119 mg / 100 g de pulpa fresca en el mango ³¹ y 0,178 mg / 100 g de pulpa fresca en la piña ³². Cabe señalar que su contenido, junto al de otros metabolitos, ha sido estudiado para determinar los cambios bioquímicos y fisiológicos que sufren estos cultivos durante el proceso de maduración y la etapa postcosecha ^{33,34}. Sin embargo, no existen estudios que hayan determinado su concentración en función del tipo de manejo en campo (convencional o ecológico).

No obstante, algunos autores si que han estudiado el contenido en diversas vitaminas en otras frutas y verduras en función del tipo de producción en campo y todos ellos coinciden en que la producción ecológica supuso un incremento significativo en la producción de ácido ascórbico y

de fenoles totales ^{16-18,35}. De igual manera que con la capacidad antioxidante, debe de tenerse en cuenta todos los factores influyentes como los climáticos, genéticos y de manejo postcosecha, puesto que el tipo de agricultura únicamente representa una variable más del conjunto total ³⁶.

4.3. Obtención de bandas de proteínas por electroforesis en gel

Los gels obtenidos muestran una serie de bandas bien diferenciadas en función del peso molecular de la proteína aislada. Estos resultados demuestran que el método de extracción y separación por electroforesis de la fracción proteica de las frutas ha sido el adecuado (**Figura 13**).

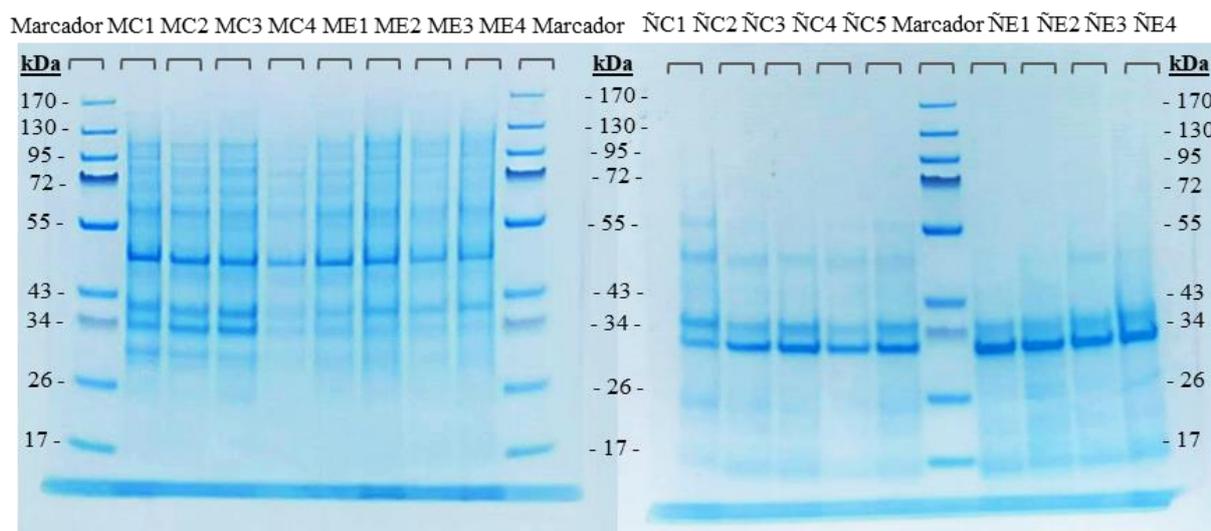


Figura 13. Gel de electroforesis de proteínas en mango (izquierda) y piña (derecha). “Marcador” Marcador de peso molecular en kilodaltons. “MC” Mango convencional. “ME” Mango ecológico. “ÑC” Piña convencional. “ÑE” Piña ecológica.

Se puede ver como en las muestras de mango convencional 1, 2 y 3 aparecen dos bandas más intensas entre los pesos de 34 y 43 kDa en comparación con las muestras ecológicas, lo que se traduce en que la proteína que se detecta en ese intervalo de pesos se encuentra en mayor cantidad en estas muestras que en las de cultivo ecológico. Actualmente se conoce muy poco sobre el proteoma de esta fruta, y los pocos estudios que hay están centrados en determinar la modulación de la expresión de proteínas asociado al proceso de maduración ³⁷. Sin embargo, un estudio ha sido capaz de identificar 2855 especies proteicas únicas en la pulpa del mango, la mayoría de ellas relacionadas con procesos de oxidación/reducción ³⁸.

En el caso de la piña se puede apreciar como las dos bandas que aparecen entre los pesos de 26 y 34 kDa son más intensas en las muestras de piña ecológica, lo que supone que estas proteínas se encuentran en mayor cantidad en este grupo. La bromelina es el compuesto más famoso de la piña y se le conoce por ser una mezcla de enzimas proteolíticas que ayudan a digerir las proteínas durante el proceso de digestión. Alguna de estas enzimas tiene un peso de 30 kDa ³⁹, coincidente con el peso de la banda más intensa que aparece en las muestras ecológicas, por lo que esta proteína podría ser más abundante en estas muestras. Para confirmar esta suposición se realizará una digestión trípica en la que identificar adecuadamente las proteínas presentes en cada banda.

5. CONCLUSIONES

En este estudio, se ha llevado a cabo una comparativa entre las frutas de mango y piña cultivadas de manera convencional y agroecológica, enfocándose en su capacidad antioxidante, perfil metabolómico y contenido proteico. Los resultados obtenidos nos permiten extraer diversas conclusiones significativas.

En primer lugar, se evidenció una notable diferencia en la capacidad antioxidante entre los mangos y piñas en función del manejo en campo. Los mangos de cultivo convencional presentaron un poder antioxidante significativamente mayor en comparación con los ecológicos, mientras que las piñas ecológicas mostraron un poder antioxidante superior a las convencionales.

El análisis metabolómico reveló la presencia de varios metabolitos clave en ambas frutas, entre los que se identificaron compuestos fundamentales para su calidad nutricional como son las vitaminas del grupo B, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. Gracias a la espectrometría de masas se pudo cuantificar el ácido pantoténico (vitamina B5), cuyo contenido fue mayor en las piñas ecológicas frente a las convencionales.

El análisis proteómico mediante electroforesis en gel también mostró diferencias en la abundancia de ciertas proteínas en ambas frutas. Mientras que en los mangos convencionales se observó una mayor intensidad de ciertas bandas, en el caso de las piñas las muestras ecológicas mostraron un mayor contenido de proteínas que, de confirmarse tras la digestión triptica, podrían tratarse de la bromelina.

En conclusión, los resultados preliminares de este estudio sugieren que el tipo de manejo agrícola (convencional vs. agroecológico) tiene un impacto significativo en el contenido en antioxidantes y en el perfil metabolómico y proteómico de mangos y piñas. Sin embargo, es crucial profundizar en esta línea de investigación para confirmar estos hallazgos y comprender mejor los mecanismos subyacentes. Además, es importante considerar los factores climáticos, el grado de maduración de la fruta, los factores genéticos y el tratamiento postcosecha, ya que estos pueden influir en los resultados obtenidos. En futuros estudios, es fundamental controlar y reducir la variabilidad causada por estos factores para obtener resultados más fiables y generalizables.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Evenson RE, Gollin D. Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science*. 2003;300(5620):758-762. doi:10.1126/science.1078710
2. Rajendra P, Yashbir Singh S. Fertiliser Nitrogen for the Life, Agriculture and the Environment. *Indian Journal of Fertilisers*. 2015;11(8):47-53.
3. Cao P, Lu C, Yu Z. Historical nitrogen fertilizer use in agricultural ecosystems of the contiguous United States during 1850-2015: application rate, timing, and fertilizer types. *Earth Syst Sci Data*. 2018;10:969-984. doi:10.5194/essd-10-969-2018
4. Lu C, Tian H. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth Syst Sci Data*. 2017;9:181-192. doi:10.5194/essd-9-181-2017
5. Penuelas J, Gargallo-Garriga A, Janssens IA, Ciais P, Obersteiner M, Klem K, Urban O, Zhu Y-G, Sardans J. Could Global Intensification of Nitrogen Fertilisation Increase Immunogenic Proteins and Favour the Spread of Coeliac Pathology? *Foods*. 2020; 9(11):1602. <https://doi.org/10.3390/foods9111602>
6. Liu Y, Pan X, Li J. A 1961-2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agron Sustain Dev*. 2015;35:83-93. doi:10.1007/s13593-014-0259-9
7. Boudh S, Singh JS. Pesticide contamination: Environmental problems and remediation strategies. *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. 2018:245-269. doi:10.1007/978-981-10-8669-4_12
8. Tudi M, Ruan HD, Wang L, et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18:1112. doi:10.3390/ijerph18031112
9. Popp J, Petó K, Nagy J. Pesticide productivity and food security. A review. *Agron Sustain Dev*. 2013;33:243-255. doi:10.1007/s13593-012-0105-x
10. FiBL Statistics - European and global organic farming statistics. FiBL Statistics. 2024 Feb 27 [cited 2024 Jun 4]. Available from: <https://statistics.fibl.org/index.html>
11. Reganold JP, Wachter JM. Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature Plants*. 2016;2. doi:10.1038/nplants.2015.221
12. Hole DG, Perkins AJ, Wilson JD, Alexander IH, Grice P V., Evans AD. Does organic farming benefit biodiversity? *Biol Conserv*. 2005;122(1):113-130. doi:10.1016/j.biocon.2004.07.018
13. Wilbois K-P, Schmidt JE. Reframing the Debate Surrounding the Yield Gap between Organic and Conventional Farming. *Agronomy*. 2019; 9(2):82. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020082>
14. Cidón CF, Figueiró PS, Schreiber D. Benefits of organic agriculture under the perspective of the bioeconomy: A systematic review. *Sustainability (Switzerland)*. 2021;13(12). doi:10.3390/su13126852

15. Altieri MA, Nicholls CI, Dinelli G, Negri L. Towards an agroecological approach to crop health: reducing pest incidence through synergies between plant diversity and soil microbial ecology. *npj Sustainable Agriculture*. 2024;2(1). doi:10.1038/s44264-024-00016-2
16. Raigón MD, Rodríguez-Burruezo A, Prohens J. Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *J Agric Food Chem*. 2010;58(11):6833-6840. doi:10.1021/jf904438n/asset/images/large/jf-2009-04438n_0001.jpeg
17. Ribes-Moya AM, Adalid AM, Raigón MD, Hellín P, Fita A, Rodríguez-Burruezo A. Variation in flavonoids in a collection of peppers (*Capsicum* sp.) under organic and conventional cultivation: effect of the genotype, ripening stage, and growing system. *J Sci Food Agric*. 2020;100(5):2208-2223. doi:10.1002/jsfa.10245
18. Ribes-Moya AM, Raigó MD, Moreno-Peris E, Fita A, Rodríguez-Burruezo A. Response to organic cultivation of heirloom *Capsicum* peppers: Variation in the level of bioactive compounds and effect of ripening. *Plos one*. 2018;13(11). doi:10.1371/journal.pone.0207888
19. Segers K, Declerck S, Mangelings D, Heyden Y Vander, Eeckhaut A Van. Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *Bioanalysis*. 2019;11(24):2297-2318. doi:10.4155/bio-2019-0014
20. Yarmush ML, Jayaraman A. Advances in proteomic technologies. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;4:349-373. doi:10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153443
21. Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth EA. Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nat Protoc*. 2007;2(4):867-870. doi:10.1038/nprot.2007.100
22. Salem MA, Yoshida T, Perez de Souza L, et al. An improved extraction method enables the comprehensive analysis of lipids, proteins, metabolites and phytohormones from a single sample of leaf tissue under water-deficit stress. *Plant Journal*. 2020;103(4):1614-1632. doi:10.1111/tpj.14800
23. Bio-Rad Protein Assay. Bio-rad. cited 2024 Jun 4. Available from: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>
24. Ngereza A.J., Pawelzik E. Antioxioint Capacity in Organically and Conventionally Grown Mango (*Mangifera indica* L.) and Pineapple (*Ananas cosmos*). *Acad J Agric Res*. 2016;4(2):53-62. doi:10.5555/20163102191
25. Ribeiro SMR, Barbosa LCA, Queiroz JH, Knödler M, Schieber A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chem*. 2008;110(3):620-626. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.067
26. Fonseca Maciel L, da Silva Oliveira C, da Silva Bispo E, da Spínola Miranda MP. Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. *British Food Journal*. 2011;113(9):1103-1113. doi:10.1108/00070701111180319

27. Yiridoe EK. Organic and conventional food: a literature review of the economics of consumer perceptions and preferences. Published online 2006. Accessed June 16, 2024. <https://www.researchgate.net/publication/229051543>
28. Weibel F.P., Bickel R., Leuthold S., Alföldi T. Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. *Acta Hort.* 2000;57:417-426. doi:10.17660/ActaHortic.2000.517.53
29. Chassy AW, Bui L, Renaud ENC, Van Horn M, Mitchell AE. Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *J Agric Food Chem.* 2006;54(21):8244-8252. doi:10.1021/jf060950p
30. Asami DK, Hong YJ, Barrett DM, Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem.* 2003;51(5):1237-1241. doi:10.1021/jf020635c
31. Lebaka VR, Wee Y-J, Ye W, Korivi M. Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2021; 18(2):741. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020741>
32. Rodríguez Ó, Gomes W, Rodrigues S, Fernandes FAN. Effect of acoustically assisted treatments on vitamins, antioxidant activity, organic acids and drying kinetics of pineapple. *Ultrason Sonochem.* 2017;35:92-102. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.09.006
33. Rosas Domínguez C, Abraham J, Avila D, et al. Content of bioactive compounds and their contribution to antioxidant capacity during ripening of pineapple (*Ananas comosus* L.) cv. Esmeralda. *Journal of Applied Botany and Food Quality.* 2018;91:61-68. doi:10.5073/jabfq.2018.091.009
34. Battistelli A, Mageroy MH, Maldonado-Celis ME, et al. Chemical Composition of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit: Nutritional and Phytochemical Compounds. *Frontiers in Plant Science.* 2019;10. doi:10.3389/fpls.2019.01073
35. Abu-Zahra T. Influence of Agricultural Practices on Fruit Quality of Bell Pepper. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2011;14(18):876-881. doi:10.3923/pjbs.2011.876.881
36. Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A. Organic food: Nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *Int J Food Sci Nutr.* 2003;54(5):357-371. doi:10.1080/09637480120092071
37. Andrade J de M, Toledo TT, Nogueira SB, Cordenunsi BR, Lajolo FM, do Nascimento JRO. 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. *J Proteomics.* 2012;75(11):3331-3341. doi:10.1016/j.jprot.2012.03.047
38. Righetti PG, Esteve C, D'Amato A, Fasoli E, Luisa Marina M, Concepción García M. A sarabande of tropical fruit proteomics: Avocado, banana, and mango. *Proteomics.* 2015;15(10):1639-1645. doi:10.1002/pmic.201400325

39. Yow AG, Bostan H, Young R, et al. Identification of bromelain subfamily proteases encoded in the pineapple genome. *Scientific Reports*. 2023;13:11605. doi:10.1038/s41598-023-38907-y

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento al Excmo. Cabildo Insular de La Palma por haber financiado este Trabajo Final de Máster que se inició en octubre del 2023 y a los agricultores Rubén Piñero y Jose Javier Yanes por cedernos las frutas ecológicas para el estudio.

Quiero empezar esta dedicatoria mencionando a todas las personas que me han rodeado en el que ha sido mi primer año en Tenerife. Pese a todas las dificultades derivadas de llegar a un sitio lejos de mi ciudad, en el que no conocía a casi nadie y todo era nuevo, me he sentido como en casa gracias a mis compañeros del laboratorio, amigos del máster y todas las personas súper majas que he conocido.

Muchas gracias, Jana por todo lo que me has enseñado, has sido una tutora excelente y he aprendido muchísimo de ti como científica pero también como madre, mujer y compañera. Gracias por apoyarme, por valorar mi trabajo y por tener toda la paciencia que has tenido enseñándome. Espero que en un futuro sigamos siendo los que más rápido caminan por los pasillos y aprendamos también a comunicarnos un poco mejor para no dejarme la mitad de las muestras por hacer sin querer (aunque posiblemente me lo dijiste pero se me olvidó apuntarlo) ...

También quiero hacer una especial mención a la mejor compi de despacho. Pauli, muchas gracias por ser como eres. Por estar ahí para decirme: “tranquilo, no pasa nada, hay que ir poquito a poco...” Gracias a ti vivo un poco menos estresado e intento tomarme la vida con un poco más de calma.

Gracias en especial a Nieves por realizar los análisis en el servicio de Espectrometría de Masas y por resolverme las (muchas) dudas que he tenido, sin ti estos resultados no habrían sido posibles. También quiero mencionar en este punto a Merchy, Joana, Jenny, Carmen y Andrea. Sois unas cracks en vuestro trabajo y gracias a vosotras me he sentido integrado y uno más en el grupo.

Gracias Ángel por estar ahí siempre. Aunque estamos cada uno en una isla y no convivimos a diario, hemos hecho viajes y planes que nunca olvidaré. Nos ha quedado un año espectacular visitando cada una de las Islas Canarias. Pese a la incertidumbre de nuestro futuro, no me arrepiento de nada y quiero seguir descubriendo nuevos lugares a tu lado. Te quiero mucho nobi.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos (tanto de Valencia como de Canarias) por todo vuestro apoyo incluso en los momentos más duros y a mis compis del máster, Zuleima y Cristina, por todas las risas y buenos momentos en clase.

ANEXO

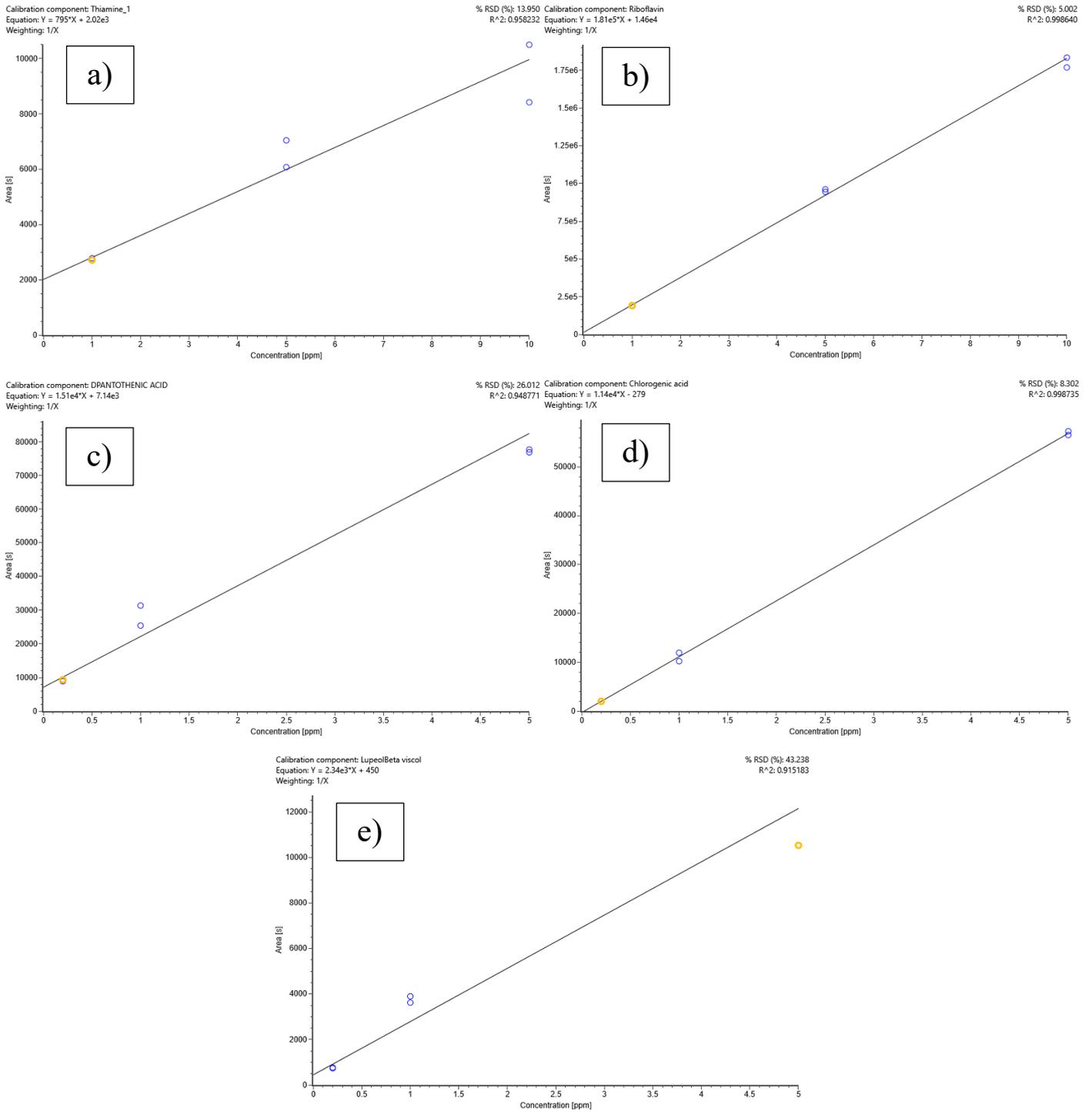
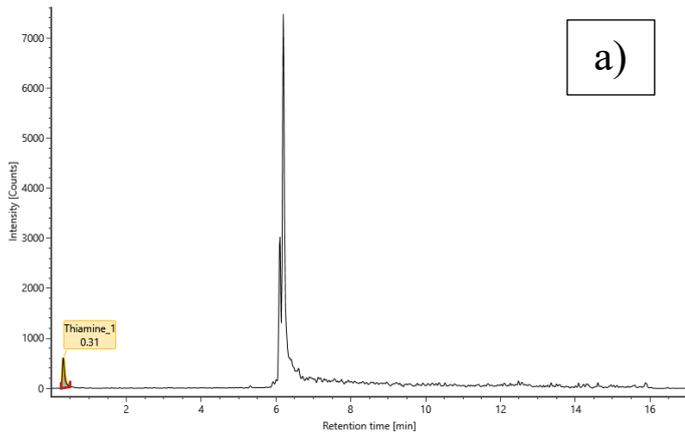


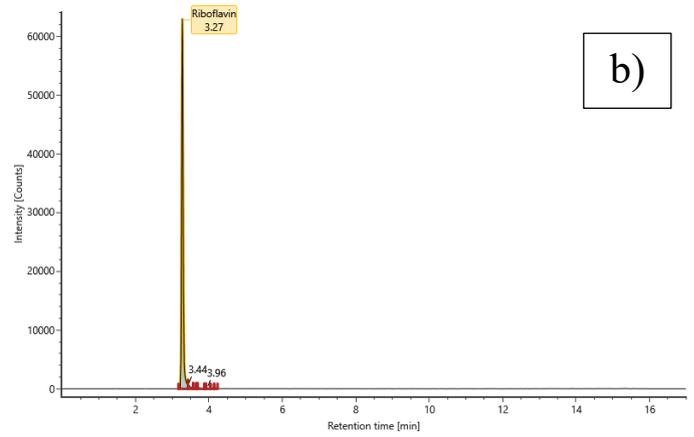
Figura A1. Recta patrón de a) Tiamina, b) Riboflavina, c) Ácido pantoténico, d) Ácido clorogénico, e) Lupeol beta viscol

Item name: B1_1
Channel name: Thiamine_1 [+H] : (32.8 PPM) 265.1120 : DT=3.49 to 3.94 ms



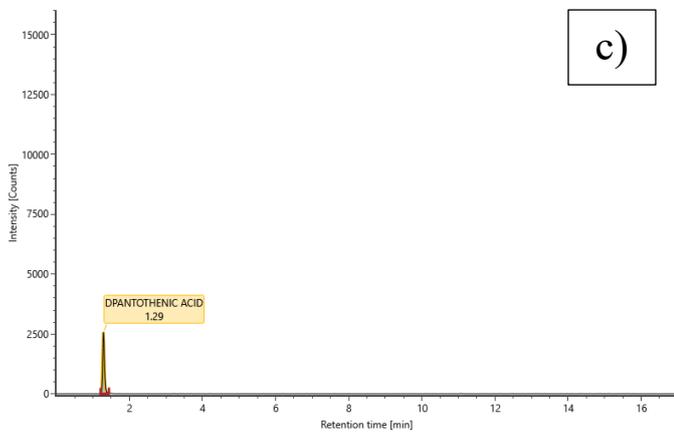
a)

Item name: B2_1
Channel name: Riboflavin [+H] : (32.8 PPM) 377.1461 : DT=4.49 to 4.97 ms



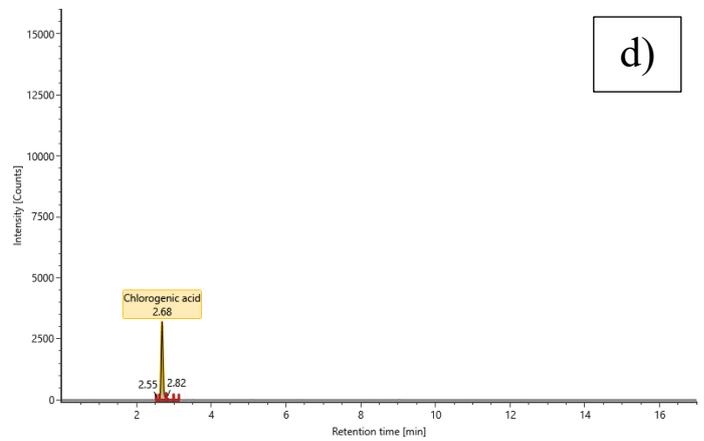
b)

Item name: B5_0_2
Channel name: DPANTOTHENIC ACID [+Na] : (32.8 PPM) 242.1001 : DT=2.95 to 3.39 ms



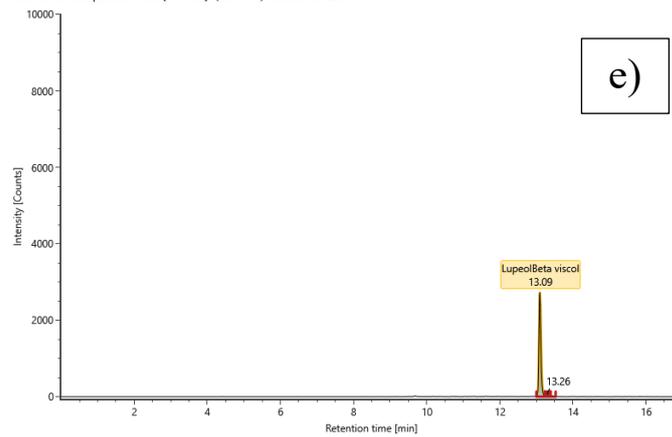
c)

Item name: Clorogenico_1
Channel name: Chlorogenic acid [+Na] : (32.8 PPM) 377.0848 : DT=4.86 to 5.34 ms



d)

Item name: Lupeol 5
Channel name: LupeolBeta viscol [+H-H2O] : (32.8 PPM) 409.3837 : DT=5.61 to 6.11 ms



e)

Figura A2. Cromatograma de a) Tiamina, b) Riboflavina, c) Ácido pantoténico, d) Ácido clorogénico, e) Lupeol beta viscol.

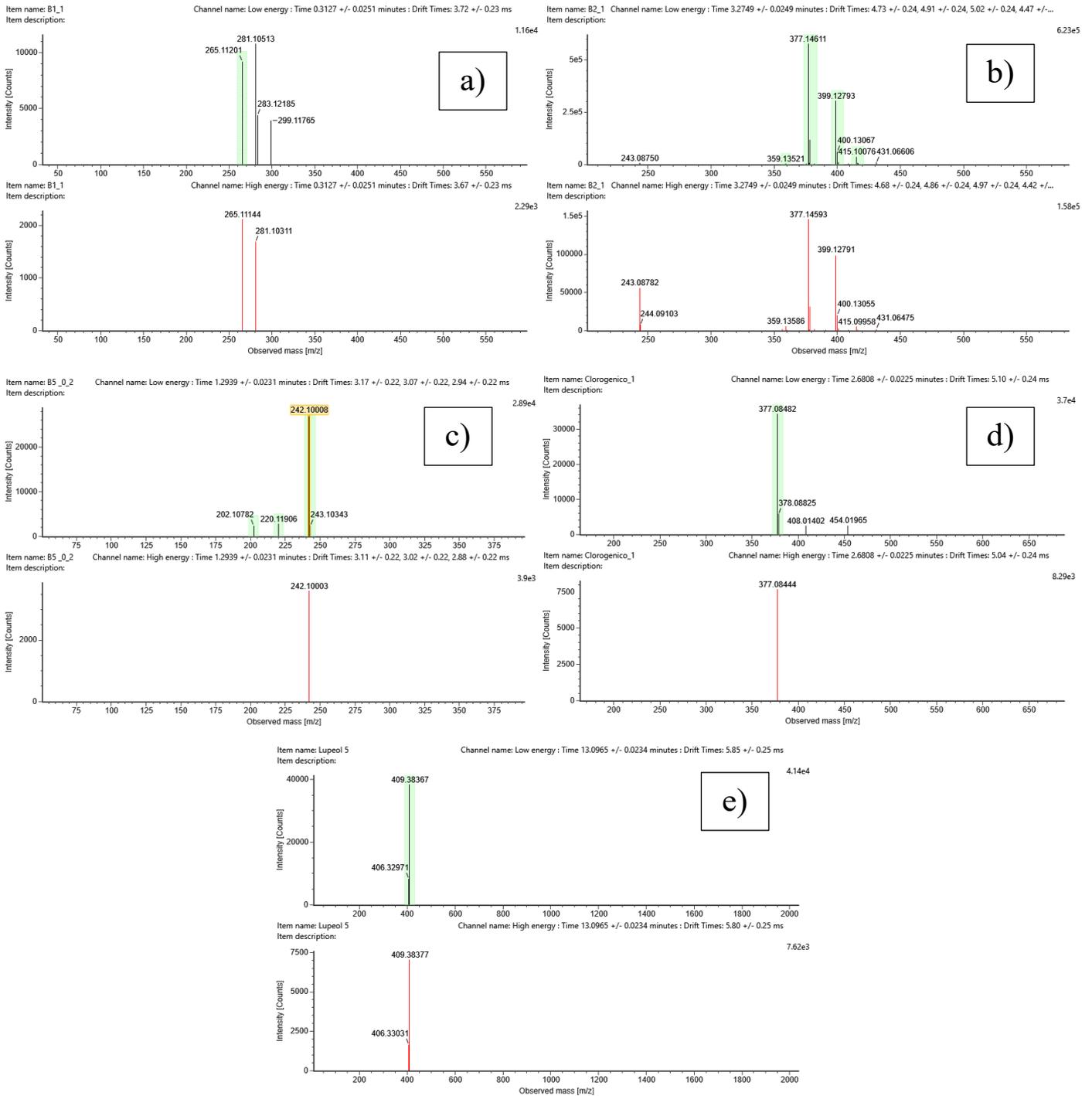


Figura A3. Perfil de fragmentación de a) Tiamina, b) Riboflavina, c) Ácido pantoténico, d) Ácido clorogénico, e) Lupeol beta viscol. El espectro de fragmentación de cada una de ellas se observa en el panel inferior de cada figura designado como “high energy”.