



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Calidad fenólica de los subproductos de mango

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Martínez Morales, Enith Salomé

DIRECTORA: Martínez Espinosa, Ruth Irene, Mgs.

LOJA-ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgs.

Ruth Irene Martínez Espinosa.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Calidad fenólica de los subproductos de mango, realizado por: Enith Salomé Martínez Morales ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 24 de Octubre de 2016

f)
Cl. 1102185863

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Enith Salomé Martínez Morales declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Calidad fenólica de los subproductos de mango, de la titulación Ingeniería en Alimentos, siendo la Mgs. Ruth Irene Martínez Espinosa directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....
Enith Salomé Martínez Morales
CI. 1104703887

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y hermanas por brindarme su respaldo, amor incondicional y acompañarme durante todo mi proceso de formación profesional; gracias a ustedes puedo culminar esta etapa con éxito. Los amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más profundo agradecimiento a mi Padre Dios por brindarme su favor y respaldo en todo momento y permitirme cumplir mi anhelo de ser profesional.

A mis padres por enseñarme a perseverar para cumplir mis sueños, por su amor y apoyo incondicional; a mis hermanas, abuelitos y demás familiares por darme su cariño y acompañarme durante esta etapa.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, especialmente a la Titulación de Ingeniería en Alimentos y a todos mis maestros durante mi proceso de formación profesional.

Un especial reconocimiento a la Mgs. Ruth Martínez quién con su experiencia y conocimientos supo dirigir ésta investigación, gracias por su apoyo y enseñanzas; de igual manera a la MSc. María del Cisne Guamán y al Ph.D. Miguel Ángel Meneses por brindarme sus conocimientos y respaldar este trabajo.

Finalmente agradezco a mis queridos amigos por su apoyo y amistad verdadera.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1. Subproductos de mango.....	5
1.2. Compuestos fenólicos.....	6
1.2.1. Cuantificación de fenoles totales.....	6
1.3. Radicales libres y antioxidantes.....	6
1.3.1. Cuantificación de capacidad antioxidante.....	7
1.3.1.1. DPPH.....	7
1.3.1.2. FRAP.....	8
1.3.1.3. Concentración media inhibitoria (IC ₅₀).....	8
1.3.1.4. Índice de actividad antioxidante (AAI).....	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
2.1. Muestras y preparación de las muestras.....	10
2.1.1. Determinación del contenido de humedad.....	10
2.2. Obtención de extractos.....	10
2.2.1. Determinación de la concentración inicial de los extractos.....	11
2.3. Cuantificación de fenoles totales.....	11
2.4. Determinación de actividad antioxidante.....	13
2.4.1. Método DPPH.....	13

2.4.2. Método FRAP.....	15
2.4.3. IC ₅₀ y AAI.....	17
2.5. Análisis estadístico.....	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
3.1. Concentración inicial de extractos.....	23
3.2. Fenoles totales.....	23
3.3. Capacidad antioxidante	24
3.4. IC ₅₀ y AAI.....	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Compuestos nutricionales y funcionales en subproductos de mango.....	5
Figura 2: Procedimiento empleado para el método Folin Ciocalteu	12
Figura 3: Procedimiento para método DPPH.....	15
Figura 4: Procedimiento aplicado para método FRAP.....	17
Figura 5: Procedimiento para IC ₅₀	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos definidos para la obtención de extractos.....	10
Tabla 2: Concentración inicial de los extractos utilizados para IC ₅₀	21
Tabla 3: Concentración inicial de los extractos de subproductos de mango.....	23
Tabla 4: Contenido de fenoles totales en subproductos de mango.....	24
Tabla 5: Capacidad antioxidante de subproductos de mango.....	25
Tabla 6: IC ₅₀ y AAI en subproductos de mango	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Determinación del contenido de humedad de subproductos de mango.....	37
Anexo B: Determinación de la concentración inicial de los extractos.....	39
Anexo C: Cuantificación de fenoles totales.....	41
Anexo D: Cuantificación de capacidad antioxidante. Método DPPH.....	49
Anexo E: Cuantificación de capacidad antioxidante. Método FRAP.....	56
Anexo F: Determinación del parámetro IC ₅₀ y AAI.....	63
Anexo G: Análisis estadístico.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AAI:	Índice de actividad antioxidante
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
BS:	Base seca
Co:	Concentración
DPPH:	2,2-difenil-1-picrihidracil
EAG:	Equivalente de ácido gálico
ET:	Equivalente de Trolox
E1:	Estándar 1
E2:	Estándar 2
E3:	Estándar 3
E4:	Estándar 4
E5:	Estándar 5
E6:	Estándar 6
E7:	Estándar 7
E8:	Estándar 8
E9:	Estándar 9
E10:	Estándar 10
E11:	Estándar 11
E12:	Estándar 12
FCR:	Reactivo Folin Ciocalteu
FRAP:	Poder de reducción férrica
g:	Gramo
HAT:	Transferencia de un átomo de hidrógeno
IC₅₀:	Capacidad media inhibitoria
mg:	Miligramo
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar

MPa:	Mega pascal
nm:	Nanómetro
ORAC:	Capacidad de absorbanza del radical oxígeno
P_{inicial}:	Peso inicial
P_{final}:	Peso final
ROS:	Especies de oxígeno reactivas
rpm:	Revoluciones por minuto
SET:	Transferencia de un electrón
%ST:	Porcentaje de sólidos totales
TPTZ:	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TRAP:	Capacidad antioxidante de captura de radicales
μL:	Microlitro
μm:	Micrómetro
μM:	Micromolar
v/v:	Volumen/volumen

RESUMEN

Buscar alternativas para el aprovechamiento de los subproductos constituye una prioridad para disminuir la contaminación ambiental y generar valor agregado a la actividad agroindustrial. El objetivo de esta investigación fue extraer y evaluar los compuestos fenólicos en subproductos de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Tomy Atkins. A partir de la piel y pulpa agotada se obtuvieron extractos con etanol, etanol-agua (50:50 v/v) y agua a 20, 40 y 60°C, en los que se determinó el contenido de fenoles totales mediante el método Folin Ciocalteu, capacidad antioxidante por los métodos DPPH y FRAP, además se valoró el parámetro IC₅₀. Los extractos etanol-agua (50:50 v/v) presentaron mayor contenido de fenoles totales (1421,11-1701,35 mg EAG/100 g) y capacidad antioxidante que los otros extractos: 137,51-178,00 µM ET/g por DPPH y 97,23-122,14 µM ET/g por FRAP; resultados que confirman las propiedades de los subproductos de mango como buenas fuentes de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante.

PALABRAS CLAVE: Capacidad antioxidante, etanol-agua, fenoles totales, subproductos de mango.

ABSTRACT

Search for alternatives to use the by-products is a priority to reduce environmental pollution and generate added value to the agroindustrial activity. The aim of this research was to extract and evaluate the phenolic compounds in by-products of mango (*Mangifera indica* L.) variety Tomy Atkins. The extracts were obtained from skin and exhausted pulp with ethanol, ethanol-water (50:50 v/v) and water at 20, 40 and 60 °C, in which the total phenol content was determined by the method Folin Ciocalteu, antioxidant capacity by DPPH and FRAP methods, additionally the IC₅₀ parameter was valued. The ethanol-water (50:50 v/v) extracts showed higher total phenol content (1421,11-1701,35 mg EAG/100 g) and antioxidant capacity than the other extracts: 137,51-178,00 μM ET/g by DPPH method and 97,23-122,14 μM ET/g by FRAP method; results prove the properties of mango by-products as good sources of phenolic compounds with antioxidant capacity.

KEYWORDS: Antioxidant capacity, ethanol-water, total phenols, mango by-products.

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera Indica L.*) es una fruta rica en compuestos bioactivos, la parte comestible constituye únicamente del 40 al 65% del peso total del fruto (Ajila et al., 2010; Barreto et al., 2008; Kim et al., 2010); la piel, pulpa agotada y semilla (subproductos) derivadas del consumo directo o procesamiento, forman parte de los 1300 millones de toneladas de pérdidas y desperdicio de alimentos generados anualmente a nivel mundial, que contaminan el medio ambiente; pues los alimentos en desintegración producen metano que es 25 veces más potente que el dióxido de carbono (FAO, 2012; FAO 2016). El potencial de los subproductos de mango como fuente promisoría de compuestos bioactivos, motivó esta investigación con el objetivo de evaluar los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante en extractos obtenidos de la piel y pulpa agotada mediante maceración dinámica utilizando solventes verdes (etanol y agua) y diferentes temperaturas de extracción (20, 40 y 60 °C).

Los resultados logrados indican que la mezcla etanol-agua (50:50 v/v) permite obtener extractos con compuestos fenólicos y capacidad antioxidante superiores a los reportados por otros autores y comparables a los de la pulpa de açai, considerada con buenas propiedades antioxidantes benéficas para la salud (Rufino et al., 2011; Schauss et al., 2006); esto abre la posibilidad a la Universidad Técnica Particular de Loja de generar alternativas transferibles a la industria para el aprovechamiento de los subproductos como ingredientes alimentarios. El uso de los subproductos potenciará el desarrollo económico del sector agroindustrial y contribuirá a la disminución del desperdicio de alimentos y contaminación ambiental.

El capítulo 1 de este trabajo muestra una revisión bibliográfica de las características de los subproductos de mango, definiciones de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y fundamentos de los métodos analíticos para su cuantificación. El capítulo de Materiales y Métodos se centra en detallar el procedimiento de obtención de los extractos, el método colorimétrico Folin Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales, los métodos DPPH y FRAP para medir actividad antioxidante, y el de IC_{50} por el método DPPH. El análisis del comportamiento de los extractos obtenidos con los diferentes tratamientos y la comparación de los resultados con datos bibliográficos se indican en el capítulo de Resultados y Discusión.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Subproductos de mango

En países tropicales el mango (*Mangifera Indica* L.) es una de las frutas más comercializadas y consumidas en forma fresca y procesada; a nivel mundial se cultivan más de 1000 variedades (Oliveira et al., 2016). Asimismo, la cantidad de subproductos de mango generados por la industria es muy alta, Berardini et al. (2005) afirman que dependiendo de la variedad, estos constituyen del 35% al 60% del peso total del fruto; la piel representa entre el 15 y 20%, la semilla del 13 al 29% (Ashoush & Gadallah, 2011; Sumaya et al., 2012).

Varios estudios atribuyen al mango y a sus subproductos propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, analgésicas e hipoglucemiantes (Masibo & He, 2009; Olivera, 2013; Vega-Vega et al., 2013), ligadas al contenido de compuestos bioactivos como polifenoles (antocianinas, catequina, epicatequina y mangiferina), carotenoides y fibra dietaria; siendo la mangiferina el compuesto fenólico con mayor presencia ($1690,4 \pm 134,8$ mg/kg de piel de mango en BS) (Berardini et al., 2005; Olivera, 2013). Los principales compuestos encontrados en los subproductos de mango (piel y semilla) se exponen en la Figura 1.

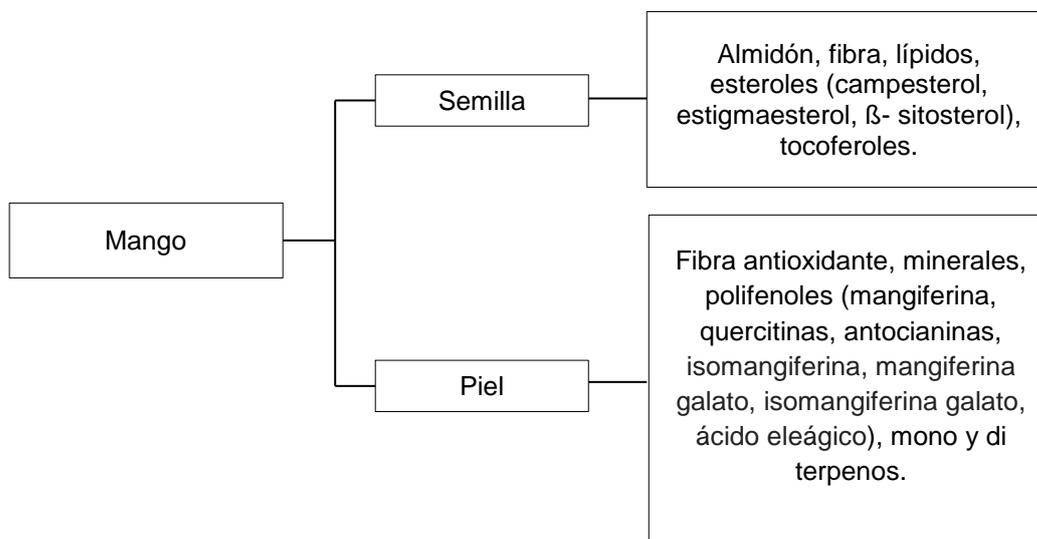


Figura 1. Compuestos nutricionales y funcionales en subproductos de mango

Fuente: Berardini et al. (2005); Jahurul et al. (2015)

Elaboración: La autora

En la actualidad se ha incorporado subproductos de mango como ingredientes en pastas y productos de panadería; convirtiéndolos en alimentos con bajo contenido calórico, ricos en fibra y con posibles propiedades funcionales (Ajila et al., 2010; Ajila et al., 2008; Ashoush & Gadallah, 2011; Vergara-Valencia et al., 2007).

1.2. Compuestos fenólicos

Son productos secundarios del metabolismo de las plantas (Pérez-Jiménez & Torres, 2011), su propiedad de óxido-reducción (redox) les permite actuar como agentes secuestrantes de radicales libres, además, actúan como agentes quelantes, inactivan cadenas de radicales libres de lípidos y previenen la conversión de hidroperóxidos a oxiradicales reactivos (Afanas'ev et al., 1989; Martínez et al., 2012).

Usando diferentes combinaciones de agua y solventes orgánicos se puede obtener, dependiendo de su polaridad, extractos con específicos compuestos fenólicos “compuestos fenólicos extraíbles” como flavonoides (catequinas, antocianinas, flavonas e isoflavonas), ácidos fenólicos, estilbenos, ligninas y otros polifenoles. Los “compuestos fenólicos no extraíbles” que permanecen en la matriz alimentaria (residuos de la extracción), son las proantocianidinas, taninos hidrolizables y oligómeros de ácidos fenólicos (Pérez-Jiménez & Torres, 2011).

1.2.1. Cuantificación de fenoles totales.

Es un análisis colorimétrico basado en el reactivo Folin Ciocalteu (FCR). La reacción entre los compuestos fenólicos y el FCR es producida a través del mecanismo de transferencia de electrones en un medio alcalino (pH ~ 10) que causa la disociación de un protón fenólico que da lugar a un anión fenolato, el cual es capaz de reducir el FCR, formando así complejos de coloración azul que son independientes de la estructura del compuesto fenólico (Huang et al., 2005; Singleton et al., 1999); su absorbancia se mide a una longitud de onda de 725 nm (Thaipong et al., 2006). La naturaleza química del FCR no ha sido exactamente definida, sin embargo el ensayo es reproducible y de fácil aplicación (Huang et al., 2005). Éste parámetro se puede utilizar como un indicador preliminar de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales (Martínez et al., 2012; Viuda-Martos et al., 2011).

1.3. Radicales libres y antioxidantes

Los radicales libres son especies de oxígeno reactivas (ROS), que se producen espontáneamente en sistemas biológicos como consecuencia de procesos metabólicos y del medio ambiente (Singh & Singh, 2008). La acumulación de ROS puede aumentar el estrés oxidativo (Mishra et al., 2012), provocando daños en moléculas biológicas, principalmente en el ADN, lípidos y proteínas (Guo et al., 2003), desencadenando enfermedades degenerativas como Alzheimer, diabetes, arteriosclerosis, inflamatorias y otras (Noguchi & Niki, 2000; Singh & Singh, 2008).

Benzie y Strain (1996) definen a un antioxidante como “una sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, previene significativamente o retrasa la oxidación de dicho sustrato”, de esta manera combaten los radicales libres interviniendo en cualquiera de las tres fases del proceso oxidativo (iniciación, propagación y terminación) (Cui et al., 2004). Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos, dentro de éste último se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitaminas como ácido ascórbico, tocoferol, y otros (Carocho & Ferreira, 2013); cuyas principales fuentes son los vegetales, frutas y algunos aceites vegetales (McDermott, 2000).

1.3.1. Cuantificación de capacidad antioxidante.

El mecanismo de acción de un antioxidante para captar radicales libres puede ser la transferencia de un electrón (SET) o de un átomo de Hidrógeno (HAT). Los métodos analíticos basados en SET miden la habilidad del antioxidante para transferir un electrón, reduciendo así un compuesto en específico, que pueden ser metales, carbonilos y radicales; y los basados en HAT miden la capacidad del antioxidante para captar radicales por donación de hidrógeno (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005; Wright et al., 2001).

Cada uno de los métodos generalmente utilizados para la cuantificación de la capacidad antioxidante miden diferentes parámetros. FRAP mide la capacidad de reducción de metales, DPPH y ABTS la capacidad de reducción de radicales orgánicos y TRAP y ORAC la capacidad de reducción del radical peróxilo; por lo que es necesario combinar al menos dos de éstos para obtener datos precisos sobre la actividad antioxidante en un sistema (Alves et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2008).

1.3.1.1. DPPH.

Éste método fue descrito por Brand-Williams et al. (1995), para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto mediante su reacción con el radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracil). Inicialmente se consideró que el principio de éste método se basaba en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre DPPH, provocando la reducción del catión DPPH^+ a DPPH_2 ; pero actualmente, varios estudios han demostrado que la reacción consiste en la transferencia de un electrón desde los aniones fenóxido al radical DPPH, provocando una decoloración de púrpura a amarillo (Foti et al., 2004; Huang et al., 2005; Kedare & Singh, 2011; Mishra et al., 2012), que es evaluada a una longitud de onda de 515 nm (Thaipong et al., 2006).

1.3.1.2. FRAP.

Es un método SET que cuantifica el poder de reducción férrica de un antioxidante, basado en la habilidad de éste en un medio de pH bajo, para reducir el complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ-Fe⁺³) a su forma ferrosa (TPTZ-Fe⁺²), generando una coloración azul con una máxima absorbancia a 593 nm. Es un método de aplicación rápida y sencilla, ya que no es necesario un pretratamiento de las muestras, los factores estequiométricos son constantes y la linealidad se mantiene en un rango amplio (Benzie & Strain, 1996; Benzie & Strain, 1999).

1.3.1.3. Concentración media inhibitoria (IC₅₀).

El parámetro IC₅₀, es una forma muy usada para expresar la capacidad antioxidante y se define como la concentración requerida del antioxidante para reducir en un 50% la cantidad inicial de DPPH (Brand-Williams et al., 1995; Pérez-Jiménez et al., 2008), mientras mayor capacidad antioxidante tenga una muestra menor será su IC₅₀ (Pérez-Jiménez et al., 2007). Su cálculo se realiza mediante una curva en la que se grafica la concentración del extracto antioxidante (eje x) frente a su porcentaje de inhibición de DPPH (eje y) (Ajila et al., 2010; Scherer & Godoy, 2009).

1.3.1.4. Índice de actividad antioxidante (AAI).

A pesar de que el método DPPH es usado universalmente, el cotejo de los resultados se complica debido a la falta de uniformidad al expresarlos; por otro lado el parámetro IC₅₀ obtenido en extractos de origen vegetal está en función de la concentración final de DPPH utilizada, lo que tampoco permite comparar resultados de forma adecuada; por lo que Scherer y Godoy (2009) plantean utilizar el índice de actividad antioxidante (AAI) como un mecanismo para estandarizar la forma de expresar los resultados de la actividad antioxidante. El AAI muestra la relación entre la concentración de DPPH en la solución de trabajo y el parámetro IC₅₀. Los autores clasifican a los extractos que muestran un AAI < 0,5 como de baja actividad antioxidante, a aquellos con AAI entre 0,5 y 1 con actividad moderada; mientras que los que presentan un AAI entre 1 y 2 se consideran con alta actividad antioxidante y con actividad muy alta a los extractos con un AAI > 2.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y preparación de las muestras

Para el presente trabajo se utilizó la mezcla de pulpa agotada (posterior a la extracción del jugo) y piel de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Tomy Atkins, procedente de la provincia de Guayas. La deshidratación de los subproductos se realizó en una estufa de convección forzada a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la pérdida significativa de capacidad antioxidante (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007), durante 48 horas. Para facilitar la molienda se aplicó una pre trituración en un molino mecánico manual y luego se utilizó el molino ultracentrífugo marca Retsch ZM 200, hasta obtener un tamaño de partícula final $\leq 355\text{ }\mu\text{m}$.

2.1.1. Determinación del contenido de humedad.

Según lo descrito en la norma AOAC 934.06 para humedad en frutas deshidratadas, se colocaron 5 g de muestra ($P_{inicial}$) en cápsulas previamente secadas. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento de deshidratación al vacío ($-0,05\text{ MPa}$) a $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas, luego fueron enfriadas en un desecador por 1 hora y pesadas; se aplicó el mismo procedimiento hasta que la muestra presentó un peso constante (P_{final}). El contenido de humedad (Anexo A) se obtuvo por pérdida de peso, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de Humedad} = \frac{P_{inicial} - P_{final}}{P_{inicial}} * 100$$

2.2. Obtención de extractos

Los tratamientos aplicados (Tabla 1) fueron definidos mediante un diseño experimental estadístico factorial, utilizando el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI. Etanol, agua y mezcla de éstos en proporción 50:50 fueron utilizados como solvente, en función de su inocuidad para el uso en alimentos.

Tabla 1. Tratamientos definidos para la obtención de extractos

Solvente	Temperatura (°C)
Etanol	20
Agua	20
Etanol-agua (50:50 v/v)	60
Etanol	40
Agua	60
Etanol-agua (50:50 v/v)	40
Etanol	60
Etanol-agua (50:50 v/v)	20
Agua	40

Elaboración: La autora

Se colocó 1 g de subproducto en un frasco boeco y se adicionaron 20 mL de solvente (muestra-solvente 1:20) (Rojas Jiménez, 2014; Sogi et al., 2013); la mezcla fue calentada en baño maría con agitación constante (maceración dinámica) de 2500 rpm durante 1 hora y 30 minutos y sometida a centrifugación a 2790 rpm por 30 minutos en una centrifuga marca CLAY ADAMS® Brand DYNAC® (Becton, Dickinson and Company, MD, USA); se registró el peso tanto del sobrenadante como de la fracción sólida, ésta última fue desechada. El sobrenadante fue almacenado en congelación en tubos de centrifuga, previamente forrados con papel aluminio, hasta su uso.

2.2.2. Determinación de la concentración inicial de los extractos.

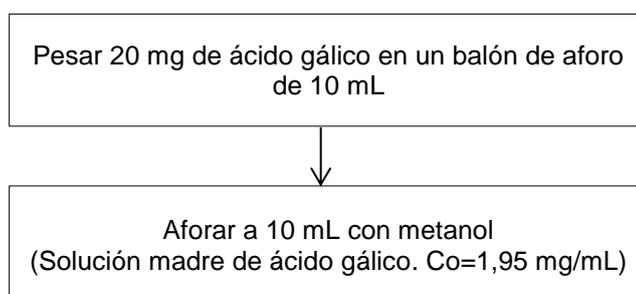
Se colocaron 2 mL de cada extracto a analizar (*alícuota*) en viales previamente secados y pesados (P_{vial}), se realizó un tratamiento de evaporación en una estufa de convección forzada, con incremento progresivo de temperatura desde 40°C hasta 100°C ± 1°C, manteniéndolos a 100°C durante 6 horas, luego fueron enfriados en un desecador por 1 hora y pesados; se aplicó el mismo procedimiento hasta que presentaron un peso constante (P_{final}). La concentración inicial (Anexo B) se obtuvo por pérdida de peso, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de extracto} = \frac{P_{final} - P_{vial}}{\text{alícuota}}$$

2.3. Cuantificación de fenoles totales

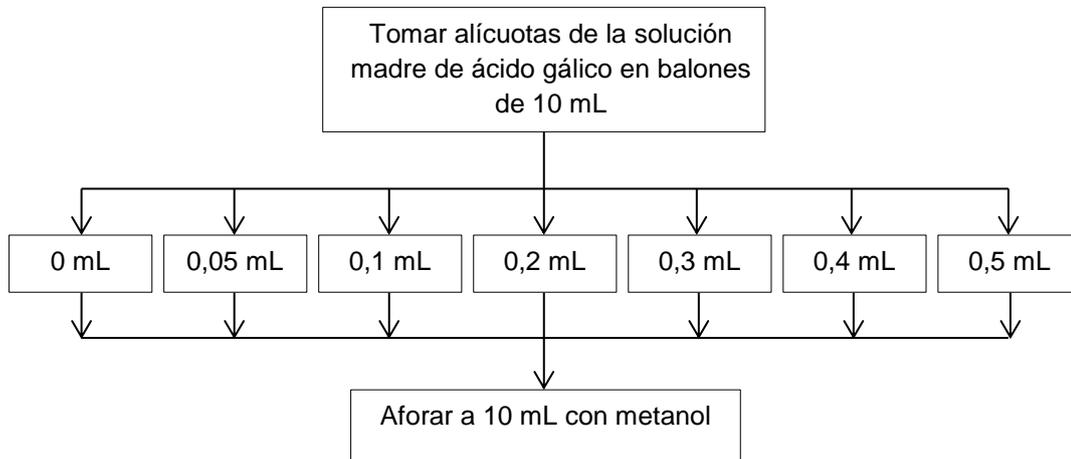
El método colorimétrico de Folin Ciocalteu en base a lo descrito por Swain y Hills (1959) con modificaciones de Thaipong et al. (2006), fue aplicado para determinar el contenido de fenoles totales en las muestras, utilizando ácido gálico como estándar; la lectura de las absorbancias se efectuó en un espectrofotómetro Visible 6400, JENWAY®, calibrado previamente con agua destilada. El procedimiento que se empleó se detalla en la Figura 2 y los cálculos en el Anexo C.

a. Preparación de solución madre de ácido gálico



b. Preparación de estándares para la curva de calibración

Thaipong et al. (2006) establecen que la linealidad del método para la curva de calibración está en el rango de 0 a 0,1 mg/mL, por lo que se tomó alícuotas de tal forma que las concentraciones de los estándares estén dentro de ese rango.



c. Lectura de absorbancias

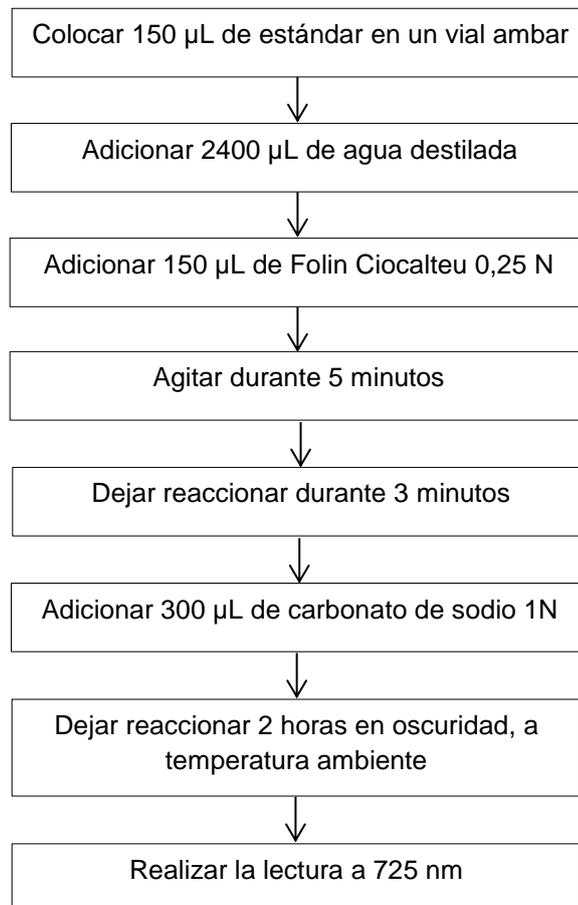


Figura 2. Procedimiento empleado para el método Folin Ciocalteu

Con los valores de las absorbancias se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (Anexo C) en el eje X vs la absorbancia en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Para la lectura de las absorbancias de los extractos se siguió el mismo procedimiento indicado en el literal c de la Figura 2; recalando que en lugar de tomar 150 μ L de estándar, se tomaron 150 μ L de cada extracto a analizar. Los valores de las absorbancias de los extractos deben ubicarse dentro del rango de los valores de la curva de calibración, siendo lo óptimo que no estén en los extremos de ésta. Los resultados fueron calculados mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de Ácido Gálico por cada 100 gramos de muestra en base seca (mg EAG/100 g de muestra BS).

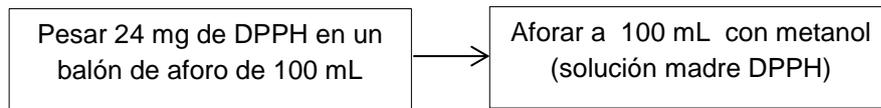
2.4. Determinación de actividad antioxidante

Considerando que la actividad antioxidante de un extracto viene dada por interacciones sinérgicas entre varios compuestos y por el modo de acción de cada uno de ellos (Pérez-Jiménez et al., 2007), se aplicaron los métodos DPPH y FRAP para evaluarla de manera adecuada.

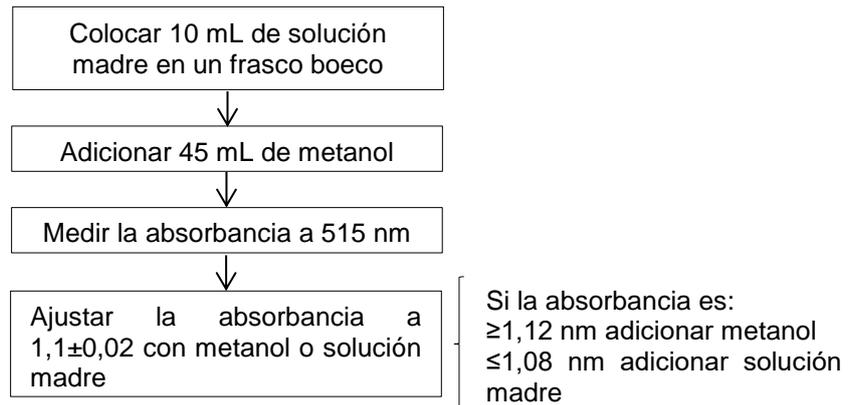
2.4.1. Método DPPH.

Se utilizó la técnica descrita por Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones de Thaipong et al. (2006), que mide en el extracto antioxidante la capacidad para atrapar el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracil) (Sharma & Bhat, 2009). Trolox fue utilizado como estándar y la lectura de las absorbancias se llevó a cabo en un espectrofotómetro Visible 6400, JENWAY®, previamente calibrado con metanol. El procedimiento seguido se detalla en la Figura 3 y los cálculos realizados en el Anexo D.

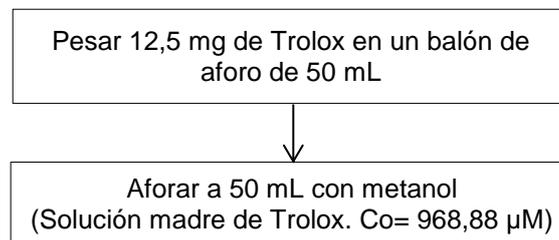
a. Preparación de solución madre DPPH



b. Preparación de solución de trabajo DPPH

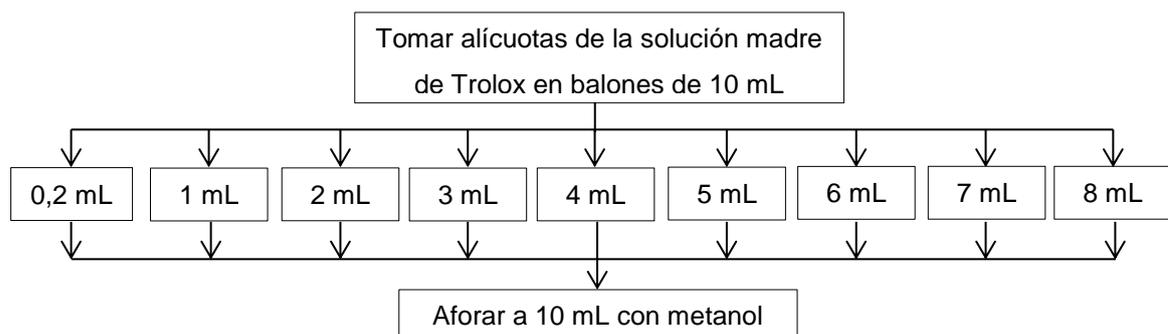


c. Preparación de solución madre de Trolox



d. Preparación de estándares para la curva de calibración

La linealidad de éste método para la curva de calibración está aproximadamente en el rango de 25 a 800 µM Trolox (Thaipong et al., 2006), por lo que se tomó alícuotas de tal forma que las concentraciones de los estándares estén dentro de ese rango.



e. Lectura de las absorbancias

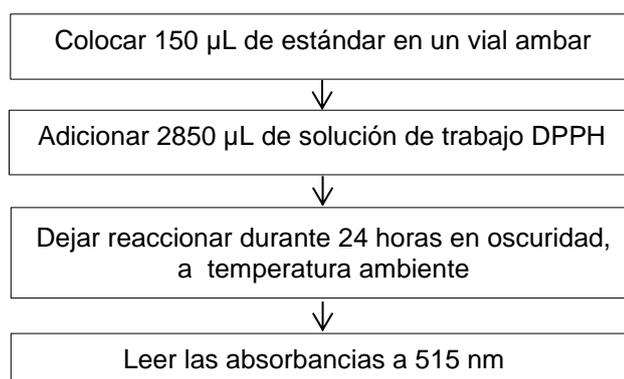


Figura 3. Procedimiento para método DPPH.

Con los valores de las absorbancias se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (Anexo D) en el eje X vs la absorbancia en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Para la lectura de las absorbancias de los extractos se siguió el mismo procedimiento indicado en el ítem e de la Figura 3; recalcando que en lugar de tomar 150 μL de estándar, se tomaron 150 μL de cada extracto a analizar. Los valores de las absorbancias de los extractos deben ubicarse dentro del rango de los valores de la curva de calibración, siendo lo óptimo que no estén en los extremos de ésta. Los resultados fueron calculados mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración y se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{M ET/g}$ de muestra BS).

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

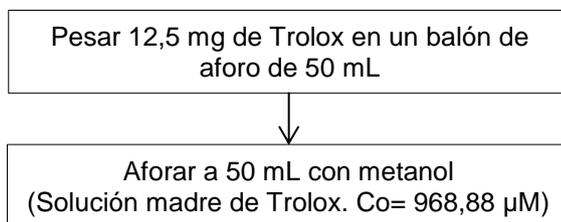
b = intersección

2.4.2. Método FRAP.

El método descrito por Benzie y Strain (1996) con modificaciones de Thaipong et al. (2006) fue aplicado para cuantificar el poder de reducción férrica en los extractos antioxidantes. Se utilizó como patrón de referencia el reactivo Trolox y la lectura de las absorbancias fue

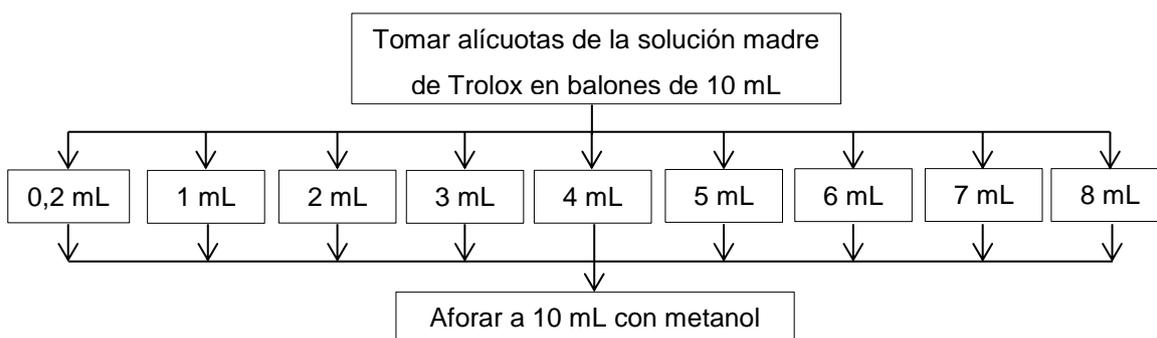
realizada en un espectrofotómetro Visible 6400, JENWAY®, previamente calibrado con agua destilada. El procedimiento aplicado se encuentra en la Figura 4 y los cálculos realizados en el Anexo E.

a. Preparación de solución madre de Trolox

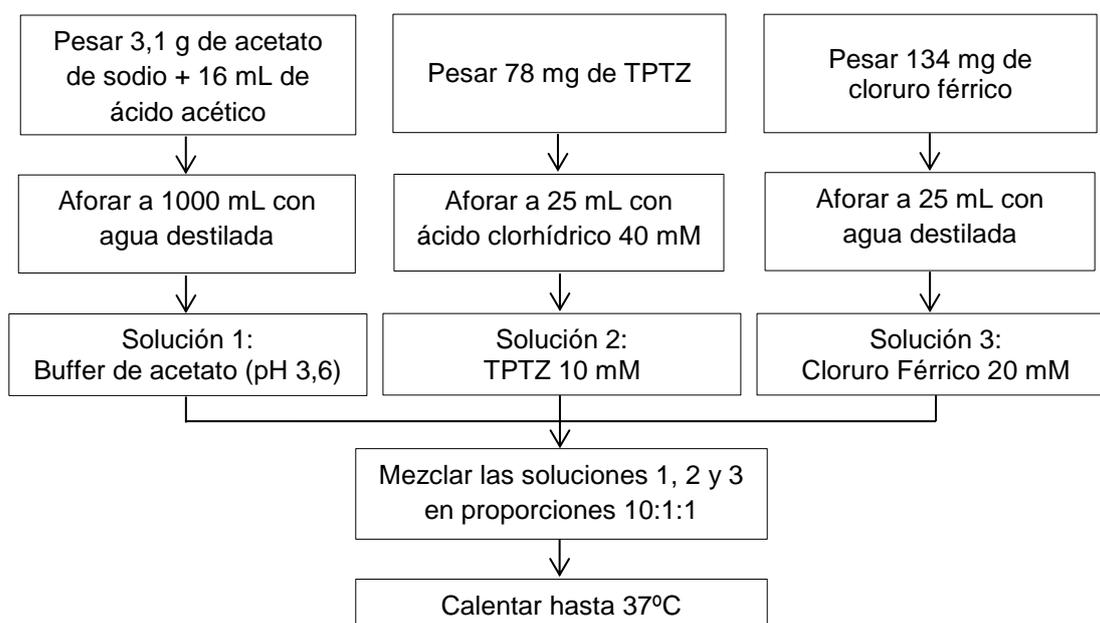


b. Preparación de estándares para la curva de calibración

La linealidad de éste método para la curva de calibración está aproximadamente en el rango de 25 a 800 µM Trolox (Thaipong et al., 2006), por lo que se tomó alícuotas de tal forma que las concentraciones de los estándares estén dentro de ese rango.



c. Preparación de solución de trabajo



d. Lectura de absorbancias

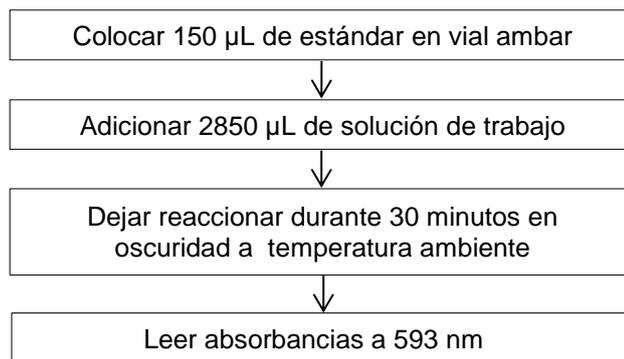


Figura 4. Procedimiento aplicado para método FRAP

Con los valores de las absorbancias se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (Anexo E) en el eje X vs la absorbancia en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Para la lectura de las absorbancias de los extractos se siguió el mismo procedimiento indicado en el ítem d de la Figura 4; recalcando que en lugar de tomar 150 μL de estándar, se tomaron 150 μL de cada extracto a analizar. Los valores de las absorbancias de los extractos deben ubicarse dentro del rango de los valores de la curva de calibración, siendo lo óptimo que no estén en los extremos de ésta. Los resultados fueron calculados mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración y se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{M ET/g}$ de muestra BS).

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

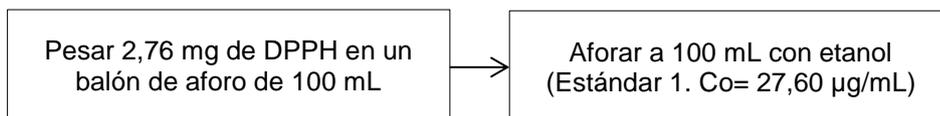
b = intersección

2.4.3. IC_{50} y AAI.

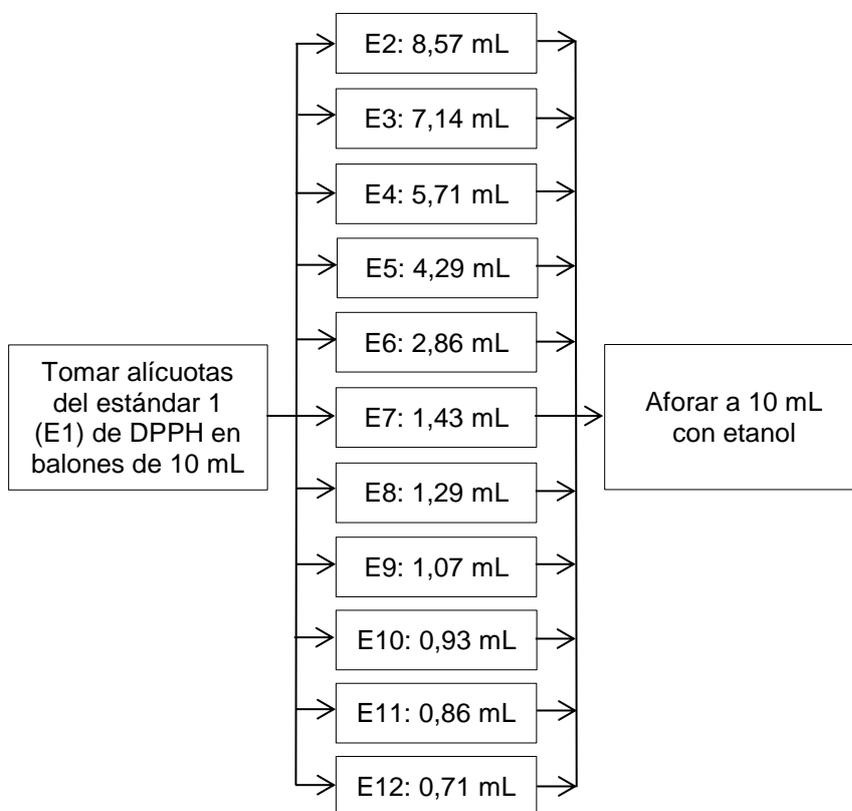
La concentración media inhibitoria (IC_{50}) se determinó únicamente en los extractos obtenidos con los tratamientos etanol-agua (50:50 v/v) a 20 y 40°C; los mismos que presentaron mayor capacidad para disminuir el radical libre DPPH y mayor poder de reducción férrica que los

demás. Se utilizó el procedimiento descrito por Scherer y Godoy (2009), usando como estándar DPPH y la lectura de las absorbancias fue realizada en un espectrofotómetro Visible 6400, JENWAY®, previamente calibrado con etanol. El procedimiento seguido se detalla en la Figura 5 y los cálculos realizados en el Anexo F.

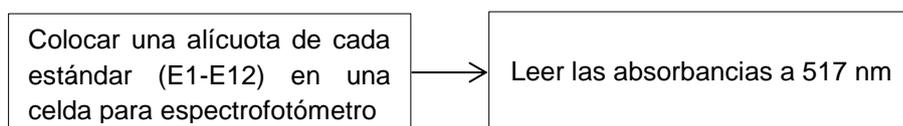
a. Preparación de estándar 1 (E1) de DPPH para curva de calibración



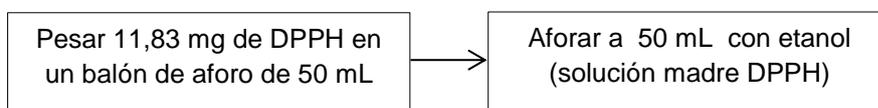
b. Preparación de estándares para la curva de calibración



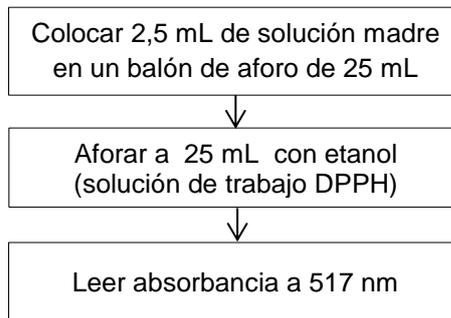
c. Lectura de absorbancias de estándares*



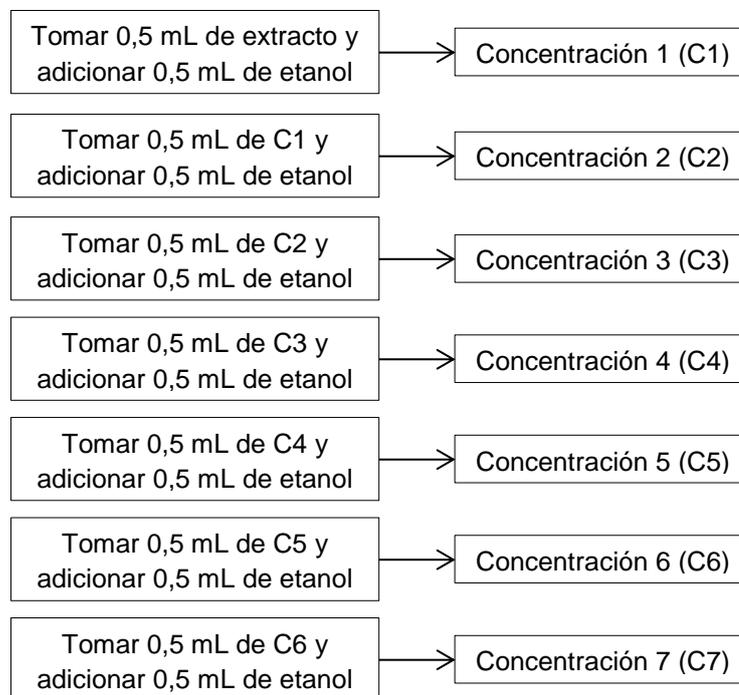
d. Preparación de solución madre DPPH



e. Preparación de solución de trabajo DPPH



f. Preparación de concentraciones de extracto antioxidante



g. Lectura de absorbancias de concentraciones de extracto

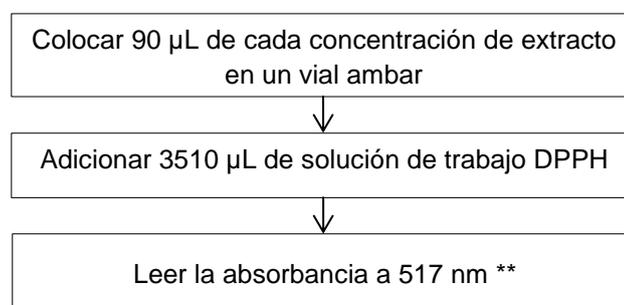


Figura 5. Procedimiento para IC₅₀

*Realizar la lectura de absorbancias de los estándares para curva de calibración inmediatamente después de su preparación.

** Leer las absorbancias cada 30 minutos, hasta que ésta no varíe (dato que se utiliza para los cálculos).

Con los valores de las absorbancias de los estándares (Figura 5 literal d.) se construyó la curva de calibración, graficando la concentración del estándar (Anexo F) en el eje X vs la absorbancia en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

En la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

Para obtener la concentración de DPPH en el tiempo 0 se reemplazó en (y) el valor de la absorbancia de la solución de trabajo DPPH, y la concentración de DPPH en el tiempo (t) fue calculada reemplazando en (y) las absorbancias de las concentraciones de los extractos, se trabajó con las absorbancias medidas a los 90 minutos las mismas que deben ubicarse dentro del rango de la curva de calibración.

El % de inhibición de DPPH fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo (t) (mol/L)}}{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 (mol/L)}} * 100$$

El valor de IC_{50} se determinó gráficamente, construyendo una curva con la concentración calculada del extracto antioxidante en el eje X, obtenida a partir de la concentración inicial de los extractos analizados, vs. el % de inhibición de DPPH en el eje Y; de esta curva se obtuvo una ecuación polinómica:

$$y = ax^2 + bx + c$$

Se despejó x para conocer la concentración del extracto que disminuye en un 50% la concentración de DPPH. La concentración calculada del extracto fue determinada a partir de la concentración inicial de los extractos analizados, obtenida mediante el método detallado en el literal 3.2.1. de éste capítulo; los valores obtenidos se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración inicial de los extractos utilizados para IC₅₀

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Concentración del extracto (µg/mL)
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	28655
		29100
		28850
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	28750
		28740
		28565

Elaboración: La autora

El índice de actividad antioxidante (AAI) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 (µg/mL)}}{IC_{50} \text{ (µg/mL)}}$$

2.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como media ± desviación estándar y utilizando el programa Minitab 16 fueron estadísticamente tratados mediante un análisis de varianza (ANOVA), y la aplicación del test de rango múltiple (Tukey) con 95% de intervalo de confianza (Anexo G) permitió determinar la diferencia significativa del contenido fenólico y capacidad antioxidante entre los tratamientos aplicados para la obtención de extractos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentración inicial de extractos

La concentración inicial de los extractos analizados se encuentra expuesta en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración inicial de los extractos de subproductos de mango

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Concentración inicial de los extracto (µg/mL)
Etanol	20	9228,33 ± 379,3
	40	11980,00 ± 1996,8
	60	12868,33 ± 853,7
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	28868,33 ± 223,1
	40	28685,00 ± 104,0
	60	29833,33 ± 1148,5
Agua	20	27625,00 ± 2379,7
	40	30293,33 ± 1194,4
	60	33426,67 ± 1898,9

Elaboración: La autora

Los valores presentados corresponden a la media ± desviación estándar de tres repeticiones.

3.2. Fenoles Totales

Los extractos obtenidos con etanol-agua (50:50 v/v) a diferentes temperaturas presentaron el mayor contenido de fenoles totales (Tabla 4), no existiendo diferencia significativa entre ellos; mientras que los obtenidos con etanol fueron diferentes entre sí, de éstos el tratamiento a 60°C fue el que mostró mayor contenido de compuestos fenólicos. En los extractos acuosos se observó un comportamiento diferente, el mayor valor se obtuvo en la extracción a 40 °C, y no existió diferencia significativa entre las extracciones a 20 y 60°C.

En el caso de las extracciones con etanol, el contenido de fenoles totales fue influenciado positivamente por el incremento de la temperatura de extracción; con etanol-agua (50:50 v/v) no se observó una clara relación entre la temperatura y los valores de fenoles totales.

La extracción etanol-agua (50:50 v/v) fue la más eficiente, debido a que los solventes se complementan entre sí, el etanol extrae el grupo de compuestos fenólicos menos polares (taninos, flavonoles), mientras que el agua extrae los compuestos más polares (antocianinas, terpenoides) (Azmir et al., 2013; Cowan, 1999; Dorta et al., 2012; Dorta Pérez, 2014).

En todos los tratamientos el contenido de fenoles de subproductos de mango fue superior al de subproductos (piel y pulpa) de guayaba (85 mg EAG/100 g) (Jiménez-Escrig et al., 2001) y al reportado por Vasco, et al. (2008) para la fracción comestible de mango (60 mg EAG/100 g), guayaba (462 mg EAG/100 g) y maracuyá (61 mg EAG/100 g); sin embargo fue inferior al

de semilla de mango deshidratada (12535 mg EAG/100 g), subproductos de uva blanca (7850 mg EAG/100 g) y tuna verde (2760 mg EAG/100 g) (Bensadón et al., 2010; Sánchez-Alonso et al., 2008; Sogi et al., 2013). Es importante resaltar que el contenido de fenoles totales determinado en los extractos etanol-agua (50:50 v/v) fue similar al reportado para la pulpa (1500 mg EAG/100g) y mezcla liofilizada de pulpa y piel de açai (1390 mg EAG/100g), considerado como fruto antioxidante con un importante rol para la salud humana (Rufino et al., 2011; Schauss et al., 2006). Hay que considerar que los datos bibliográficos mencionados corresponden a extracciones con mezclas acuosas de solventes orgánicos diferentes al etanol, y en algunos casos incluso se utilizó ácidos fuertes.

Tabla 4. Contenido de fenoles totales en subproductos de mango

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Fenoles Totales (mg EAG/100 g muestra BS)
Etanol	20	473,78 ± 70,6 ^a
	40	842,96 ± 104,1 ^b
	60	1325,77 ± 241,0 ^c
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	1421,11 ± 11,0 ^{dc}
	40	1464,04 ± 83,1 ^{dc}
	60	1701,35 ± 76,2 ^d
Agua	20	679,74 ± 60,3 ^{ba}
	40	1287,44 ± 166,7 ^c
	60	905,27 ± 44,6 ^b

EAG: Equivalentes de ácido gálico. **BS:** Base seca

Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Elaboración: La autora

Los resultados de la presente investigación fueron mayores que los reportados por Martínez, et al. (2012), para extractos obtenidos con etanol a temperatura ambiente a partir de subproductos de mango variedad Tommy Atkins y Haden cultivados en Ecuador (283 mg EAG/100g), esto podría deberse a que la temperatura potenció la extracción de los compuestos fenólicos (Dorta et al., 2012).

3.3. Capacidad antioxidante

La capacidad de reducción del radical libre DPPH y reducción férrica (FRAP) (Tabla 5) fue mayor en los extractos obtenidos con etanol-agua (50:50 v/v); Meneses et al. (2013) afirman que la mezcla entre éstos dos solventes extrae mayor cantidad de antioxidantes que solamente etanol. Entre los extractos obtenidos a 20 y 40 °C no existió diferencia significativa; a 60°C se evidenció una disminución de la capacidad antioxidante. Aunque generalmente las extracciones se realizan entre 20 y 30 °C, algunos autores afirman que el aumento de

temperatura potencia la extracción debido al incremento de la solubilidad y velocidad de difusión de los compuestos fitoquímicos en los solventes utilizados, sin embargo las altas temperaturas pueden provocar pérdidas por volatilización, degradación de los compuestos fitoquímicos, o por la reacción entre otros componentes de la materia prima y los antioxidantes, dificultando su extracción (Dorta et al., 2012; González & González, 2010; Yap et al., 2009).

Tabla 5. Capacidad antioxidante de subproductos de mango

Solvente de extracción	Temperatura de extracción		DPPH	FRAP
	(°C)		($\mu\text{M ET/g}$ muestra BS)	($\mu\text{M ET/g}$ muestra BS)
Etanol	20		39,27 \pm 1,0 ^a	24,96 \pm 0,7 ^a
	40		67,47 \pm 4,5 ^b	69,68 \pm 1,2 ^b
	60		57,56 \pm 10,8 ^{ba}	71,71 \pm 3,0 ^b
Etanol-agua (50:50 v/v)	20		167,75 \pm 13,9 ^c	122,14 \pm 12,8 ^c
	40		178,00 \pm 0,1 ^c	118,73 \pm 9,6 ^c
	60		137,51 \pm 20,3 ^d	97,23 \pm 10,1 ^d
Agua	20		48,50 \pm 2,8 ^{ba}	41,82 \pm 2,6 ^{ea}
	40		67,68 \pm 9,1 ^b	63,40 \pm 5,8 ^b
	60		63,08 \pm 1,5 ^{ba}	58,61 \pm 4,3 ^{be}

ET: Equivalentes de Trolox. **BS:** Base seca

Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Elaboración: La autora

Martínez et al. (2012) cuantificaron la capacidad de reducción del radical DPPH en extractos de subproductos de mango obtenidos con etanol a temperatura ambiente y reportó un valor de $31,7 \pm 0,99 \mu\text{M ET/g}$; éste es inferior a los obtenidos en la presente investigación. La capacidad antioxidante cuantificada mediante el método DPPH fue mayor a la de la pulpa comestible ($3,1 \pm 0,6 \mu\text{M ET/g}$) (Vasco et al., 2008) y menor a la reportada por Sogi et al. (2013) para la semilla de mango ($1799,54 \mu\text{M ET/g}$). La capacidad antioxidante de los extractos etanol-agua (50:50 v/v) fue mayor a la de la cáscara de banano y cacao ($119 \pm 0,4$ y $122 \pm 0,2 \mu\text{M ET/g}$ respectivamente) (Espinosa Cumbicus, 2014).

La actividad antioxidante cuantificada por método FRAP fue superior a la de subproductos de tuna roja y verde ($47,35$ y $40,39 \mu\text{M ET/g}$ respectivamente) (Bensadón et al., 2010); pero menor a la reportada por Rojas Jiménez (2014) para subproductos de guayaba ($173 \mu\text{M ET/g}$). Los extractos obtenidos con etanol-agua (50:50 v/v) a 20 y 40 °C evidencian un poder de reducción férrica similar al de la pulpa de açai ($128,44 \mu\text{M ET/g}$) considerada de alto poder antioxidante (Rufino et al., 2011).

Sogi et al. (2014) reportaron que la capacidad antioxidante de reducción férrica en extractos de pulpa deshidratada de mango (a 60°C) obtenidos con metanol-agua (80:20 v/v) es 71 μM ET/g, similar a la cuantificada en ésta investigación en los extractos de etanol a 60°C, superior a la de los extractos acuosos, pero inferior a la de los obtenidos con etanol-agua (50:50 v/v). Martínez et al. (2012) exponen que la capacidad antioxidante cuantificada por método FRAP en extractos de subproductos de mango obtenidos con etanol a temperatura ambiente es $13,7 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ET/ g, inferior a la obtenida en la presente investigación.

La mejor capacidad antioxidante de los extractos de etanol-agua (50:50 v/v), se puede vincular con el alto contenido de fenoles; pues éstos son los principales responsables de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales (Martínez et al., 2012; Scherer & Godoy, 2009; Silva et al., 2005); y aunque el contenido de fenoles fue más alto en el extracto obtenido a 60°C, éste reportó una menor capacidad antioxidante con respecto a los tratamientos a 20 y 40 °C, lo que permite deducir que la temperatura (60°C) influyó negativamente sobre ésta característica; situación que fue diferente en los tratamientos con etanol y agua, los cuales presentaron valores similares de capacidad antioxidante para todas las temperaturas de extracción.

Los extractos obtenidos con etanol y agua se pueden utilizar para la elaboración de productos de consumo directo o para enriquecer matrices alimentarias; los resultados obtenidos en éste trabajo permiten tener un panorama del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante que pudiera tener el producto que se elabore industrialmente.

3.4. IC₅₀ y AAI

El parámetro IC₅₀ fue medido a partir de una concentración de DPPH de 24,87 y 25,42 $\mu\text{g/mL}$, los resultados no presentaron diferencia significativa entre los tratamientos de extracción. Los extractos analizados en ésta investigación (Tabla 6) mostraron una capacidad inhibitoria del radical DPPH mucho menor que compuestos puros como el ácido gálico (1,12 $\mu\text{g/mL}$) y quercitina (1,90 $\mu\text{g/mL}$) determinados con una concentración inicial de DPPH de 30,75 $\mu\text{g/mL}$ (Scherer & Godoy, 2009); y similar a la del ácido ascórbico (62,40 $\mu\text{g/mL}$) (Shirwaikar et al., 2006) que tiene un bajo poder antioxidante en comparación con los polifenoles (Jiménez-Escrig et al., 2001).

La variedad de unidades utilizadas para expresar el IC₅₀, dificulta la comparación del poder antioxidante entre diferentes extractos obtenidos de vegetales y frutas. Jiménez-Escrig et al. (2001) reportaron una alta capacidad de inhibición del radical DDPH para pulpa y piel de guayaba (1,92 y 3,70 g/g de DPPH respectivamente); mientras que para la pulpa de açai se

reportó una capacidad inhibitoria menor (10,20 g/g de DPPH) (Rufino et al., 2011). Relacionando los resultados de ésta investigación con los mencionados anteriormente se puede deducir que el poder inhibitorio de los subproductos de mango es moderado, y el índice de actividad antioxidante inferior a 0,5 catalogado como bajo de acuerdo a lo propuesto por Scherer y Godoy (2009).

Tabla 6. IC₅₀ y AAI en subproductos de mango

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	IC₅₀ (µg/mL)	AAI
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	68,31 ± 6,2 ^a	0,37 ± 0,03 ^a
	40	65,26 ± 1,2 ^a	0,38 ± 0,01 ^a

IC₅₀: Capacidad media inhibitoria **AAI:** Índice de actividad antioxidante

Los valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Elaboración: La autora

Los hallazgos de éste trabajo pueden constituir un aporte significativo para la utilización de los subproductos de mango en la industria alimentaria, considerando que se logró establecer que la mezcla etanol-agua (50:50 v/v) permite obtener extractos ricos en compuestos fenólicos y de alta capacidad antioxidante comparables a los resultados reportados para la pulpa de açai; el contenido de fenoles totales fue entre 2 y 3 veces superior al de los extractos de subproductos de mango (Tommy Atkins y Haden) obtenidos con metanol y acetona (550 mg EAG/100 g) (Martínez et al., 2012), de igual manera la capacidad antioxidante fue mucho mayor que la de los extractos mencionados.

CONCLUSIONES

- De los tratamientos aplicados, la mezcla etanol-agua en proporciones 50:50 v/v permitió la mejor extracción de compuestos fenólicos que también presentaron la mayor capacidad de reducción de metales y del radical libre DPPH.
- Los extractos obtenidos con la mezcla etanol-agua (50:50 v/v) poseen un alto contenido de fenoles totales y buena capacidad antioxidante, resultados que potencian el valor funcional de los subproductos y su utilización como ingredientes alimentarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Afanas' ev, I. B., Dcrozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*, 38(11), 1763-1769.
- Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., & Rao, U. P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 219-224.
- Ajila, C. M., Leelavathi, K., & Rao, U. P. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of cereal science*, 48(2), 319-326.
- Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996-1002.
- Ashoush, I. S., & Gadallah, M. G. E. (2011). Utilization of mango peels and seed kernels powders as sources of phytochemicals in biscuit. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 35-42.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., & Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5599-5610.
- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Goñi, I. (2010). By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 210-216.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.
- Benzie, I. F., & 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.

- Berardini, N., Knödler, M., Schieber, A., & Carle, R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 442-452.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., & Murthy, M. V. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(5), 771-799.
- Dorta, E., Lobo, M. G., & Gonzalez, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 77(1), C80-C88.
- Dorta, E., Lobo, M. G., & González, M. (2012). Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 45(2), 261-268.
- Dorta Pérez, E. (2014). Obtención de extractos con elevada actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de piel y semilla de mango.
- Espinosa Cumbicus, Johanna Del Cisne. (2014). *Potencial de los subproductos de cacao (Theobroma cacao L.) y banano (Musa sapientum) como fuente de fibra dietaria antioxidante*. (Ingeniero en Industrias Agropecuarias), Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- FAO. (2016). El clima está cambiando. La alimentación y la agricultura también. From : <http://www.fao.org/world-food-day/2016/theme/es/>
- FAO. (2012). *Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención*. Roma.

- Foti, M. C., Daquino, C., & Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *The Journal of organic chemistry*, 69(7), 2309-2314.
- González, M., & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2(12), 1842-1866.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(12), 1719-1726.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., Nyam, K. L., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. M. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. *Food chemistry*, 183, 173-180.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Kim, H., Moon, J. Y., Kim, H., Lee, D. S., Cho, M., Choi, H. K., & Cho, S. K. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry*, 121(2), 429-436.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3), 1520-1526.
- Masibo, M., & He, Q. (2009). Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties—a review. *Food Reviews International*, 25(4), 346-370.
- McDermott, J. H. (2000). Antioxidant nutrients: current dietary recommendations and research update. *Journal of the American Pharmaceutical Association (1996)*, 40(6), 785-799.

- Meneses, N. G., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152-158.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Noguchi, N., & Niki, E. (2000). Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1538-1546.
- Oliveira, B. G., Costa, H. B., Ventura, J. A., Kondratyuk, T. P., Barroso, M. E., Correia, R. M., & Romão, W. (2016). Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). *Food chemistry*, 204, 37-45.
- Olivera Fox, E. M. (2013). *Evaluación de subproducto obtenido en la elaboración de jugos de mango y guayaba como fuente de fibra antioxidante* (Doctoral dissertation).
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.
- Pérez-Jiménez, Jara, & Saura-Calixto, Fulgencio (2007). *Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas*. Paper presented at the V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Cartagena, Murcia, España.
- Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 12713-12724.
- Prior, R. L., Wu, X., & 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.
- Rojas Jiménez, Ximena Alexandra. (2014). *Valoración de los subproductos de mango (*Mangifera Indica* L.) y guayaba (*Psidium Guajava* L.) como fuente de fibra dietaria y antioxidante*. (Bioquímico Farmacéutico), Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.

- Rufino, M., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Oliveira, M. S., & Saura-Calixto, F. (2011). Açai (Euterpe oleraceae) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, *44*(7), 2100-2106.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., & Borderías, A. J. (2008). Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(1), 42-50.
- Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., & Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe oleraceae mart.(acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(22), 8604-8610.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, *112*(3), 654-658.
- Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., & Punitha, I. S. R. (2006). In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*(9), 1906-1910.
- Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., & Dias, A. C. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. *Food chemistry*, *90*(1), 157-167.
- Singh, S., & Singh, R. P. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food reviews international*, *24*(4), 392-415.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, *299*, 152-178.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, *113*(4), 1202-1205.
- Sogi, D. S., Siddiq, M., Greiby, I., & Dolan, K. D. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tommy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food chemistry*, *141*(3), 2649-2655.

- Sogi, D. S., Siddiq, M., & Dolan, K. D. (2014). Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 564-568.
- Sumaya Martínez, Ma. Teresa, Sánchez Herrera, Leticia Mónica, Torres García, Gerardo, y García Paredes, Diego. (2012). Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 30, 826-833.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 669-675.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816-823.
- Vega-Vega, V., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Bernal-Mercado, A. T., Gonzalez-Aguilar, G. A., Ruiz-Cruz, S., & Ayala-Zavala, J. F. (2013). Antimicrobial and antioxidant properties of byproduct extracts of mango fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1).
- Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Ruales, J., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 722-729.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5), 1217-1223.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173-1183.

Yap, C. F., Ho, C. W., Mustapha, W. A. W., Chan, S. W., Lee, C. Y., & Leong, Y. S. (2009). Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, 38(4), 511-520.

ANEXOS

Anexo A. Determinación del contenido de humedad de subproductos de mango

Muestra	P cápsula (g)	P_{inicial} muestra (g)	P cápsula + muestra (g)	P_{final} muestra (g)	Contenido de humedad (g/100g)	Media
1	91,5504	5,0035	96,3483	4,7979	4,1091	
2	123,0127	5,0207	127,8150	4,8023	4,3321	4,17 ± 0,1
3	127,0613	5,0625	131,9172	4,8559	4,0810	

La fórmula aplicada es:

$$\text{Contenido de Humedad} = \frac{P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}}{P_{\text{inicial}}} * 100$$

$$P_{\text{final}} = P_{\text{cápsula+muestra}} - P_{\text{cápsula}}$$

Reemplazando los valores obtenidos en la primera muestra se tiene:

$$\text{Contenido de Humedad} = \frac{5,0035 \text{ g} - 4,7979 \text{ g}}{5,0035 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Contenido de Humedad} = 4,1091 \text{ g/100g}$$

Se aplicó la misma fórmula para las tres muestras y se obtuvo la media ± desviación estándar para el contenido de humedad de la materia prima.

% de Sólidos Totales (%ST):

Muestra	% Sólidos Totales	Media
1	95,8909	
2	95,6679	95,83 ± 0,1
3	95,9190	

El % de Sólidos Totales de la muestra (%ST) fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ ST} = 100\% \text{ ST} - \text{contenido de humedad}$$

Al reemplazar el valor del contenido de humedad de la primera muestra, tenemos:

$$\% \text{ ST} = 100 - 4,1091$$

$$\% \text{ ST} = 95,8909\% \text{ ST}$$

Se aplicó la misma fórmula para las tres muestras y se obtuvo la media \pm desviación estándar para el % de sólidos totales de la muestra.

Anexo B. Determinación de la concentración inicial de los extractos

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	P _{vial} (g)	P _{extracto seco + vial} (g)	Concentración del extracto	
				(g/mL)	(µg/mL)
Etanol	20	10,14991	10,16921	0,00965	9650
		20,73408	20,75191	0,00892	8915
		21,54231	21,56055	0,00912	9120
	40	9,87016	9,89871	0,01427	14275
		10,12527	10,14655	0,01064	10640
		9,83745	9,85950	0,01103	11025
	60	10,00979	10,03439	0,01230	12300
		10,08149	10,10919	0,01385	13850
		10,12790	10,15281	0,01246	12455
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	9,83109	9,88840	0,02866	28655
		10,05475	10,11295	0,02910	29100
		9,83464	9,89234	0,02885	28850
	40	10,09820	10,15570	0,02875	28750
		10,05659	10,11407	0,02874	28740
		10,04627	10,10340	0,02857	28565
	60	22,16543	22,22248	0,02853	28525
		10,24370	10,30505	0,03067	30675
		9,89059	9,95119	0,03030	30300
Agua	20	9,97385	10,02778	0,02696	26965
		9,90871	9,96924	0,03027	30265
		10,18842	10,23971	0,02564	25645
	40	10,11000	10,17311	0,03156	31555
		10,01520	10,07549	0,03015	30145
		26,98473	27,04309	0,02918	29180
	60	10,03988	10,11110	0,03561	35610
		9,90455	9,96887	0,03216	32160
		10,04420	10,10922	0,03251	32510

Para obtener la concentración inicial de cada extracto se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de extracto} = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{vial}}}{\text{alícuota}}$$

La alícuota tomada fue 2 mL para todos los extractos.

Al reemplazar los valores obtenidos del primer extracto con etanol a 20°C, se tiene:

$$\text{Concentración del extracto} = \frac{10,16921 \text{ g} - 10,14991 \text{ g}}{2 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración del extracto} = 0,00965 \text{ g/mL}$$

Se aplicó la misma fórmula para obtener la concentración inicial de todos los extractos y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

Anexo C. Cuantificación de fenoles totales

C1. Preparación de reactivos

Folin Ciocalteu 0,25 N

El reactivo Folin Ciocalteu es líquido por lo tanto se aplica la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

De donde:

C₁: Concentración inicial del reactivo

V₁: Alícuota a tomar para la obtención de la concentración deseada

C₂: Concentración deseada

V₂: Volumen preparado del reactivo a la concentración deseada

Se despejó V₁:

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{0,25 \text{ N} * 10 \text{ mL}}{2 \text{ N}}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ mL}$$

Al tomar 1,25 mL de Folin Ciocalteu 2 N y aforar a 10 mL con agua destilada obtenemos el reactivo Folin Ciocalteu 0,25 N.

Carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1 N

PM (Na ₂ CO ₃) (g/mol)	Equivalente químico (Na ₂ CO ₃) (g/mol)	Volumen a preparar (mL)
106	53	25

Al trabajar con la definición de normalidad se emplea el equivalente químico del reactivo:

$$\begin{array}{r} 53 \text{ g} \\ \times \\ \hline x \end{array} \begin{array}{r} 1000 \text{ MI} \\ \times \\ 25 \text{ MI} \end{array} \begin{array}{r} \text{---} \\ \text{---} \end{array} \begin{array}{r} 1 \text{ N} \\ 1 \text{ N} \end{array}$$

$$x = \frac{53 \text{ g} * 25 \text{ mL} * 1 \text{ N}}{1000 \text{ mL} * 1 \text{ N}}$$

$$x = 1,325 \text{ g}$$

Al pesar 1,325 g de carbonato de sodio y aforar a 25 mL con agua destilada obtenemos el reactivo carbonato de sodio 1N.

C2. Preparación de solución madre de ácido gálico y estándares

Para conocer la concentración de la solución madre de ácido gálico se hizo una relación entre la cantidad pesada, su porcentaje de pureza y el volumen preparado; de la siguiente manera:

$$C_{SM} = \frac{m \cdot p}{v}$$

De donde:

C_{SM} : Concentración de la solución madre (ácido gálico)

m: Cantidad pesada de ácido gálico

p: Pureza de ácido gálico

v: Volumen preparado de la solución madre

Cantidad pesada de ácido gálico (mg)	Pureza Ácido gálico (%)	Volumen de aforo (mL)	Concentración solución madre (mg/mL)
20	97,50	10	1,95

Así tenemos:

$$C_{SM} = \frac{20 \text{ mg} \cdot 0,975}{10 \text{ mL}}$$

$$C_{SM} = 1,95 \text{ mg/mL}$$

Al transformar las unidades de mg/mL a mg/L, tenemos:

$$C_{SM} = 1,95 \text{ mg/mL} \cdot 1000 \text{ mL}$$

$$C_{SM} = 1950 \text{ mg/L}$$

A partir de este valor se calcularon las concentraciones de los estándares, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

De donde:

C_{SM} : Concentración de la solución madre (ácido gálico)

V_{SM} : Volumen de la solución madre

C_E : Concentración del estándar (ácido gálico)

V_E : Volumen preparado del estándar (ácido gálico)

Thaipong et al. (2006) establecen que la linealidad del método para la curva de calibración está en el rango de 0 a 0,1 mg/mL, por lo que se deberá tomar alícuotas de tal forma que las concentraciones de los estándares estén dentro de ese rango. Entonces al tomar una alícuota de 0,05 mL de la solución madre y aforar a 10 mL con metanol, obtenemos la siguiente concentración:

$$C_E = \frac{C_{SM} * V_{SM}}{V_E}$$
$$C_E = \frac{1,95 \text{ mg/mL} * 0,05 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$C_E = 0,00975 \text{ mg/mL}$$

Tomando alícuotas equidistantes, tenemos las siguientes concentraciones:

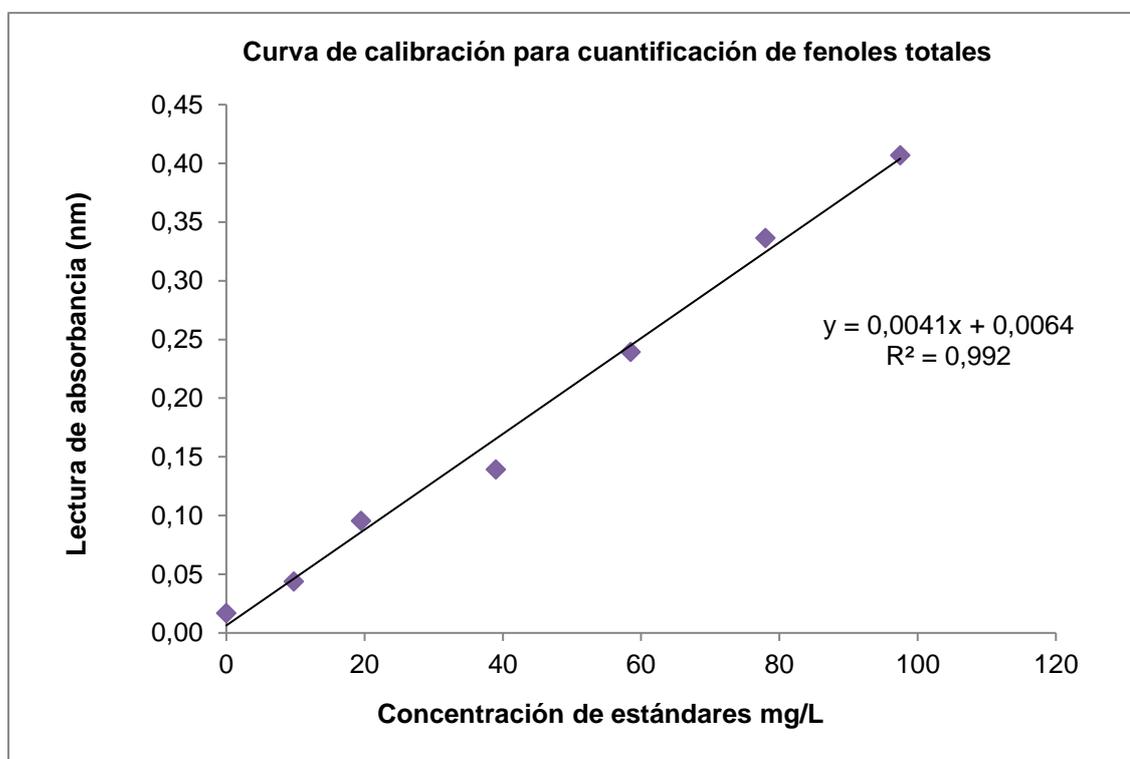
Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración del estándar (mg/mL) (mg/L)	
0,00	10	0,00000	0,00
0,05	10	0,00975	9,75
0,10	10	0,01950	19,50
0,20	10	0,03900	39,00
0,30	10	0,05850	58,50
0,40	10	0,07800	78,00
0,50	10	0,09750	97,50

C3. Curva de calibración

Se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (mg/L) en el eje X vs la absorbancia del estándar en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (mg/L)	Absorbancias (nm)
1	0,00	10	0,00	0,017
2	0,05	10	9,75	0,044
3	0,10	10	19,50	0,095
4	0,20	10	39,00	0,139
5	0,30	10	58,50	0,239
6	0,40	10	78,00	0,336
7	0,50	10	97,50	0,407

Pendiente 0,0041
Intersección 0,0064
 R^2 0,992
R 0,9960



C4. Resultados de la cuantificación de fenoles totales

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Peso muestra para extracto (g)	Factor de dilución del extracto para el análisis ¹	Absorbancia (nm)	Fenoles Totales ²	Fenoles totales ³
Etanol	20	1,020	1:20	0,053	442,53	461,81
		1,000	1:20	0,047	392,85	409,96
		1,030	1:20	0,062	526,64	549,58
	40	1,020	1:20	0,085	751,79	784,54
		1,000	1:20	0,101	922,93	963,13
		1,020	1:20	0,085	748,61	781,21
	60	1,030	1:20	0,120	1072,86	1119,59
		1,020	1:20	0,133	1214,09	1266,98
		1,030	1:20	0,167	1524,35	1590,75
Etanol- agua (50:50 v/v)	20	1,010	1:10	0,290	1371,33	1431,06
		1,030	1:10	0,294	1363,64	1423,04
		1,010	1:10	0,286	1350,40	1409,22
	40	1,000	1:10	0,289	1376,91	1436,89
		1,000	1:10	0,312	1492,36	1557,36
		1,000	1:10	0,281	1339,51	1397,86
	60	1,020	1:10	0,356	1673,52	1746,42
		1,020	1:10	0,330	1545,99	1613,33
		1,030	1:10	0,359	1671,48	1744,29
Agua	20	1,030	1:10	0,152	687,98	717,95
		1,070	1:10	0,135	584,76	610,23
		1,040	1:10	0,152	681,36	711,04
	40	1,020	1:10	0,294	1375,42	1435,33
		1,010	1:10	0,268	1265,07	1320,18
		1,010	1:10	0,226	1060,61	1106,81
	60	1,020	1:10	0,185	852,54	889,68
		1,010	1:10	0,196	915,72	955,61
		1,060	1:10	0,188	834,18	870,51

¹El factor de dilución está en función de la concentración del extracto inicial, éste debe permitir que las absorbancias estén dentro del rango de la curva de calibración; si está muy concentrado se diluye y si está muy diluido se concentra por rotaevaporación. Para la dilución se utiliza el mismo solvente usado para obtener el extracto inicial. Para encontrar el factor de dilución adecuado se usa la prueba ensayo-error.

² Los resultados están expresados en mg EAG/100 g muestra BH

³ Los resultados están expresados en mg EAG/100 g muestra BS, para su cálculo se utilizó el % de Sólidos Totales (ST) indicado en el Anexo A.

El volumen de extracto (sobrenadante) de todos los tratamientos fue 20 mL.

Los resultados fueron calculados mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración, que en éste caso es:

$$y = mx + b$$

$$y = 0,0041x + 0,0064$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

De donde se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y - 0,0064}{0,0041}$$

Se reemplaza en (y) el valor de la absorbancia, para este ejemplo tomaremos el valor de la primera muestra (Etanol 20°C):

$$x = \frac{0,053 - 0,0064}{0,0041}$$

$$x = 11,285 \text{ mg EAG/L}$$

Por definición esta concentración está dada en un litro de solución, pero la muestra fue diluida en un volumen final de 20 mL:

$$\begin{array}{ccc} 11,285 \text{ mg EAG} & \times & 1000 \text{ mL} \\ X & & 20 \text{ mL} \end{array}$$
$$x = 0,226 \text{ mg EAG}$$

La dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL de un volumen total de sobrenadante de 20 mL:

$$\begin{array}{ccc}
 0,226 \text{ mg EAG} & \times & 1 \text{ mL} \\
 X & & 20 \text{ mL} \\
 \hline
 x = 4,514 \text{ mg EAG}
 \end{array}$$

Esta concentración está presente en el valor pesado de la muestra de subproducto de mango. Con el fin de comparar resultados se lo reporta en un peso de referencia (100g):

$$\begin{array}{ccc}
 4,514 \text{ mg EAG} & \times & 1,020 \text{ g} \\
 X & & 100 \text{ g} \\
 \hline
 x = 442,531 \text{ mg EAG/100 g de muestra BH}
 \end{array}$$

Este valor está expresado en base húmeda. Utilizando el porcentaje de sólidos totales de la muestra, podemos transformarlo a base seca:

$$\begin{array}{ccc}
 442,531 \text{ mg EAG} & \times & 95,83\% \text{ ST} \\
 X & & 100\% \text{ ST} \\
 \hline
 x = 461,808 \text{ mg EAG/100 g de muestra BS}
 \end{array}$$

Este mismo procedimiento fue aplicado para obtener el contenido de fenoles totales en todas las muestras.

Anexo D. Cuantificación de capacidad antioxidante. Método DPPH.

D1. Preparación de solución madre de Trolox y estándares

Para conocer la concentración de la solución madre de Trolox se hizo una relación entre la cantidad pesada, el peso molecular del reactivo y el volumen preparado de solución. De la siguiente manera:

Cantidad pesada de Trolox (g)	Pureza Trolox (%)	PM Trolox (g/mol)	Volumen de aforo (mL)	Concentración solución madre (μ M)
0,0125	97	250,29	50	968,88

$$\begin{array}{rcl} 250,29 \text{ g} & \times & 1000 \text{ mL} \text{ — } 1\text{M} \\ 0,0125 \text{ g} & \times & 50 \text{ mL} \text{ — } X \end{array}$$

$$x = \frac{0,0125 \cancel{\text{g}} * 1000 \cancel{\text{mL}} * 1\text{M}}{250,29 \cancel{\text{g}} * 50 \cancel{\text{mL}}}$$

$$x = 0,000998 \text{ M}$$

De donde:

- 0,0125 g: Cantidad pesada de Trolox
- 50 mL: Volumen preparado de solución madre de Trolox
- 250,29 g: Peso molecular del Trolox
- 1000 mL: Volumen por definición de molaridad
- 1 M: Concentración por definición de molaridad

Al transformar las unidades de M a μ M tenemos:

$$x = 0,000998 \cancel{\text{M}} * \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \cancel{\text{M}}}$$

$$x = 998,84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no es 100% puro, se realiza la corrección con el porcentaje de pureza:

$$\begin{array}{ccc} 998,84 \mu\text{M} & \times & 100\% \\ X & & 97\% \end{array}$$

$$x = \frac{998,84 \mu\text{M} * 97\%}{100 \%}$$

$$x = 968,88 \mu\text{M}$$

A partir de éste valor se calcularon las concentraciones de los estándares, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

De donde:

C_{SM} : Concentración de la solución madre (Trolox)

V_{SM} : Volumen tomado de la solución madre

C_E : Concentración del estándar (Trolox)

V_E : Volumen preparado del estándar (Trolox)

La linealidad éste método para la curva de calibración está aproximadamente en el rango de 25 a 800 μM Trolox (Thaipong et al., 2006). Entonces al tomar una alícuota de 0,2 mL de la solución madre y aforar a 10 mL con metanol, obtenemos la siguiente concentración:

$$C_E = \frac{C_{SM} * V_{SM}}{V_E}$$

$$C_E = \frac{968,88 \mu\text{M} * 0,2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$C_E = 19,38 \mu\text{M}$$

Tomando alícuotas equidistantes, tenemos las siguientes concentraciones:

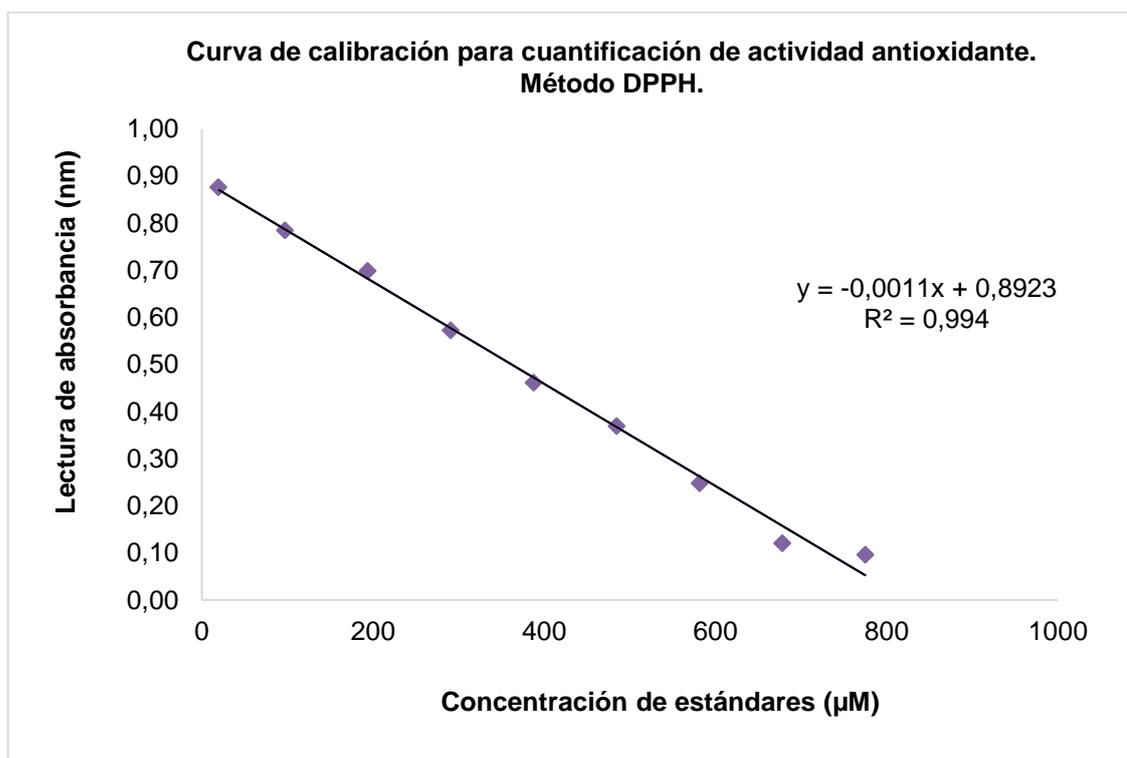
Alícuota solución madre (mL)	Aforo (mL)	Concentración de Trolox (μM)
0,2	10	19,38
1,0	10	96,89
2,0	10	193,77
3,0	10	290,66
4,0	10	387,55
5,0	10	484,44
6,0	10	581,33
7,0	10	678,21
8,0	10	775,10

D2. Curva de calibración

Se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (μM) en el eje X vs la absorbancia del estándar en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (μM)	Absorbancias (nm)
1	0,2	10	19,38	0,876
2	1,0	10	96,89	0,785
3	2,0	10	193,77	0,699
4	3,0	10	290,66	0,573
5	4,0	10	387,55	0,462
6	5,0	10	484,44	0,370
7	6,0	10	581,33	0,248
8	7,0	10	678,21	0,121
9	8,0	10	775,10	0,096

Pendiente -0,0011
Intersección 0,8923
 R^2 0,994
R 0,997



D3. Resultados de la cuantificación de capacidad antioxidante

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Peso muestra para extracto (g)	Factor de dilución del extracto para el análisis ¹	Absorbancia (nm)	Capacidad antioxidante	
					(µM ET/ g BH)	(µM ET/ g BS) ²
Etanol	20	1,020	1:10	0,675	38,73	40,42
		1,000	1:10	0,689	36,96	38,57
		1,030	1:10	0,682	37,18	38,80
	40	1,020	1:15	0,656	63,27	66,03
		1,000	1:15	0,668	61,17	63,84
		1,020	1:15	0,632	69,51	72,54
	60	1,030	1:20	0,746	51,65	53,90
		1,020	1:20	0,705	66,77	69,68
		1,030	1:20	0,759	47,06	49,11
Etanol- agua (50:50 v/v)	20	1,010	1:20	0,488	145,56	151,90
		1,030	1:20	0,422	166,04	173,27
		1,010	1:20	0,418	170,65	178,08
	40	1,000	1:20	0,423	170,65	178,09
		1,000	1:20	0,423	170,65	178,09
		1,000	1:20	0,424	170,41	177,84
	60	1,020	1:25	0,746	109,31	114,08
		1,020	1:25	0,705	142,59	148,80
		1,030	1:25	0,759	143,41	149,66
Agua	20	1,030	1:10	0,623	47,48	49,55
		1,070	1:10	0,607	48,54	50,65
		1,040	1:10	0,644	43,41	45,30
	40	1,020	1:10	0,543	62,20	64,91
		1,010	1:10	0,478	74,58	77,83
		1,010	1:10	0,571	57,78	60,30
	60	1,020	1:10	0,548	61,31	63,98
		1,010	1:10	0,566	58,74	61,30
		1,060	1:10	0,535	61,29	63,96

¹ El factor de dilución está en función de la concentración del extracto inicial, éste debe permitir que las absorbancias estén dentro del rango de la curva de calibración; si está muy concentrado se diluye y si está muy diluido se concentra por rotaevaporación. Para la dilución se utiliza el mismo solvente usado para obtener el extracto inicial. Para encontrar el factor de dilución adecuado se usa la prueba ensayo-error.

² Para su cálculo se utilizó el % de Sólidos Totales (% ST) indicado en el Anexo A.

El volumen de extracto (sobrenadante) de todos los tratamientos fue 20 mL.

Los resultados fueron calculados mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = - 0,0011x + 0,8923$$

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

De donde se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y - 0,8923}{-0,0011}$$

Se reemplaza en (y) el valor de la absorbancia, para este ejemplo tomaremos el valor de la primera muestra (Etanol 20°C):

$$x = \frac{0,675 - 0,8923}{-0,0011}$$

$$x = 197,545 \mu\text{M ET/L}$$

Por definición esta concentración está dada en un litro de solución, pero la muestra fue diluida en un volumen final de 10 mL:

$$\begin{array}{ccc} 197,545 \mu\text{M ET} & \times & 1000 \text{ mL} \\ X & & 10 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = 1,975 \mu\text{M ET}$$

La dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL de un volumen total de sobrenadante de 20 mL:

$$\begin{array}{ccc} 1,975 \mu\text{M ET} & \times & 1 \text{ mL} \\ X & & 20 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = 39,509 \mu\text{M ET}$$

Esta concentración está presente en el valor pesado de la muestra de subproducto de mango. Con el fin de comparar resultados se lo reporta en un peso de referencia (1g):

$$\begin{array}{ccc} 39,509 \mu\text{M ET} & \times & 1,020 \text{ g} \\ X & & 1 \text{ g} \end{array}$$

x = 38,734 $\mu\text{M ET/g}$ de muestra BH

Este valor está expresado en base húmeda. Utilizando el porcentaje de sólidos totales de la muestra, podemos transformarlo a base seca:

$$\begin{array}{ccc} 38,734 \mu\text{M ET} & \times & 95,83 \% \text{ST} \\ X & & 100\% \text{ ST} \end{array}$$

x = 40,422 $\mu\text{M ET/g}$ de muestra BS

Este mismo procedimiento fue aplicado para obtener la capacidad antioxidante en todas las muestras.

Anexo E. Cuantificación de capacidad antioxidante. Método FRAP.

E1. Preparación de solución madre de Trolox y estándares

Para conocer la concentración de la solución madre de Trolox se hizo una relación entre la cantidad pesada, el peso molecular del reactivo y el volumen preparado de solución. De la siguiente manera:

Cantidad pesada de Trolox (g)	Pureza _{Trolox} (%)	PM _{Trolox} (g/mol)	Volumen de aforo (mL)	Concentración solución madre (μ M)
0,0125	97	250,29	50	968,88

$$\begin{array}{rcl}
 250,29 \text{ g} & \times & 1000 \text{ mL} \text{ — } 1\text{M} \\
 0,0125 \text{ g} & & 50 \text{ mL} \text{ — } X
 \end{array}$$

$$x = \frac{0,0125 \cancel{\text{g}} * 1000 \cancel{\text{mL}} * 1\text{M}}{250,29 \cancel{\text{g}} * 50 \cancel{\text{mL}}}$$

$$x = 0,000998 \text{ M}$$

De donde:

0,0125 g: Cantidad pesada de Trolox

50 mL: Volumen preparado de solución madre de Trolox

250,29 g: Peso molecular del Trolox

1000 mL: Volumen por definición de molaridad

1 M: Concentración por definición de molaridad

Al transformar las unidades de M a μ M tenemos:

$$x = 0,000998 * 10^{-4} \cancel{\text{M}} * \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \cancel{\text{M}}}$$

$$x = 998,84 \mu\text{M}$$

Como el reactivo no es 100% puro, se realiza la corrección con el porcentaje de pureza:

$$\begin{array}{ccc} 998,84 \mu\text{M} & \times & 100\% \\ X & & 97\% \end{array}$$

$$x = \frac{998,84 \mu\text{M} * 97\%}{100 \%}$$

$$x = 968,88 \mu\text{M}$$

A partir de este valor se calcularon las concentraciones de los estándares, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{SM} V_{SM} = C_E V_E$$

De donde:

C_{SM} : Concentración de la solución madre (Trolox)

V_{SM} : Volumen de la solución madre

C_E : Concentración del estándar (Trolox)

V_E : Volumen preparado del estándar (Trolox)

La linealidad éste método para la curva de calibración está aproximadamente en el rango de 25 a 800 μM Trolox (Thaipong et al., 2006). Entonces al tomar una alícuota de 0,2 mL de la solución madre y aforar a 10 mL con metanol, obtenemos la siguiente concentración:

$$C_E = \frac{C_{SM} * V_{SM}}{V_E}$$

$$C_E = \frac{968,88 \mu\text{M} * 0,2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$C_E = 19,38 \mu\text{M}$$

Tomando alícuotas equidistantes, tenemos las siguientes concentraciones:

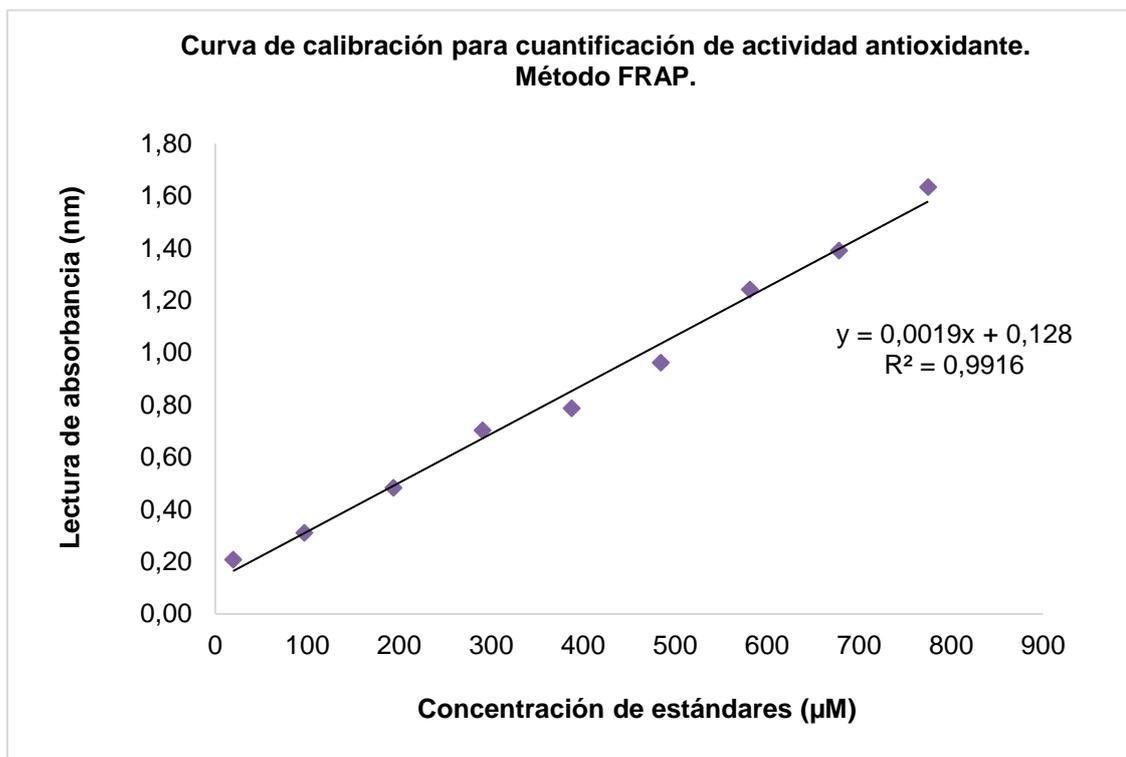
Alícuota solución madre (mL)	Aforo (mL)	Concentración de Trolox (μM)
0,2	10	19,38
1,0	10	96,89
2,0	10	193,77
3,0	10	290,66
4,0	10	387,55
5,0	10	484,44
6,0	10	581,33
7,0	10	678,21
8,0	10	775,10

E2. Curva de calibración

Se construyó la curva de calibración, graficando la concentración calculada del estándar (μM) en el eje X vs la absorbancia del estándar en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (μM)	Absorbancias (nm)
1	0,2	10	19,38	0,207
2	1,0	10	96,89	0,310
3	2,0	10	193,77	0,482
4	3,0	10	290,66	0,703
5	4,0	10	387,55	0,787
6	5,0	10	484,44	0,962
7	6,0	10	581,33	1,241
8	7,0	10	678,21	1,391
9	8,0	10	775,10	1,634

Pendiente 0,0019
Intersección 0,128
 R^2 0,9916
R 0,996



E3. Resultados de la cuantificación de capacidad antioxidante

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Peso muestra para extracto (g)	Factor de dilución del extracto para el análisis ¹	Absorbancia (nm)	Capacidad antioxidante	
					(µM ET/ g BH)	(µM ET/ g BS) ²
Etanol	20	1,020	1:10	0,367	24,70	25,77
		1,000	1:10	0,354	23,75	24,79
		1,030	1:10	0,356	23,30	24,32
	40	1,020	1:10	0,787	67,97	70,93
		1,000	1:10	0,752	65,68	68,55
		1,020	1:10	0,774	66,67	69,57
	60	1,030	1:10	0,787	67,31	70,25
		1,020	1:10	0,826	72,07	75,21
		1,030	1:10	0,781	66,77	69,68
Etanol- agua (50:50 v/v)	20	1,010	1:10	1,245	116,41	121,49
		1,030	1:10	1,397	129,65	135,30
		1,010	1:10	1,136	105,05	109,63
	40	1,000	1:10	1,141	106,60	111,24
		1,000	1:10	1,307	124,11	129,51
		1,000	1:10	1,179	110,63	115,45
	60	1,020	1:15	0,685	86,27	90,03
		1,020	1:15	0,703	89,06	92,94
		1,030	1:15	0,808	104,19	108,73
Agua	20	1,030	1:10	0,537	41,80	43,62
		1,070	1:10	0,546	41,15	42,95
		1,040	1:10	0,496	37,28	38,90
	40	1,020	1:10	0,733	62,44	65,16
		1,010	1:10	0,754	65,24	68,08
		1,010	1:10	0,652	54,58	56,95
	60	1,020	1:10	0,655	54,35	56,72
		1,010	1:10	0,712	60,90	63,55
		1,060	1:10	0,664	53,23	55,55

¹ El factor de dilución está en función de la concentración del extracto inicial, éste debe permitir que las absorbancias estén dentro del rango de la curva de calibración; si está muy concentrado se diluye y si está muy diluido se concentra por rotaevaporación. Para la dilución se utiliza el mismo solvente usado para obtener el extracto inicial. Para encontrar el factor de dilución adecuado se usa la prueba ensayo-error.

² Para su cálculo se utilizó el % de Sólidos Totales (% ST) indicado en el Anexo A.

El volumen de extracto (sobrenadante) de todos los tratamientos fue 20 mL.

Los resultados fueron calculados mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

En este caso la ecuación de la recta es:

$$y = 0,0019x + 0,128$$

De donde se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y - 0,128}{0,0019}$$

Se reemplaza en (y) el valor de la absorbancia, para este ejemplo tomaremos el valor de la primera muestra (Etanol 20°C):

$$x = \frac{0,367 - 0,128}{0,0019}$$

$$x = 125,965 \mu\text{M ET/L}$$

Por definición esta concentración está dada en un litro de solución, pero la muestra fue diluida en un volumen final de 10 mL:

$$\begin{array}{ccc} 125,965 \mu\text{M ET} & \times & 1000 \text{ mL} \\ X & & 10 \text{ mL} \\ x = 1,260 \mu\text{M ET} & & \end{array}$$

La dilución se realizó tomando una alícuota de 1 mL de un volumen total de sobrenadante de 20 mL:

$$\begin{array}{ccc} 1,260 \mu\text{M ET} & \times & 1 \text{ mL} \\ X & & 20 \text{ mL} \\ x = 25,193 \mu\text{M ET} & & \end{array}$$

Esta concentración está presente en el valor pesado de la muestra de subproducto de mango. Con el fin de comparar resultados se lo reporta en un peso de referencia (1g):

$$\begin{array}{ccc} 25,193 \mu\text{M ET} & \times & 1,020 \text{ g} \\ X & & 1 \text{ g} \\ x = 24,699 \mu\text{M ET/ g de muestra BH} & & \end{array}$$

Este valor está expresado en base húmeda. Utilizando el porcentaje de sólidos totales de la muestra, podemos transformarlo a base seca:

$$\begin{array}{ccc} 24,699 \mu\text{M ET} & \times & 95,83 \% \text{ST} \\ X & & 100\% \text{ ST} \\ x = 25,775 \mu\text{M ET/ g de muestra BS} & & \end{array}$$

Este mismo procedimiento fue aplicado para obtener el contenido de fenoles totales en todas las muestras.

Anexo F. Determinación del parámetro IC₅₀ y AAI

F1. Preparación de estándares para curva de calibración

Para conocer la cantidad de DPPH necesaria para preparar el Estándar 1 se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_{E1} = \frac{m}{v}$$

De donde:

C_{E1}: Concentración del Estándar 1

m: Cantidad pesada de DPPH

v: Volumen preparado

PM _{DPPH} (g/mol)	Aforo (mL)	Concentración Estándar 1 (mol/L)
394,32	100	0,00007

$$m = C_{E1} * v$$

$$m = 0,00007 \text{ mol/L} * 0,1 \text{ L}$$

$$m = 0,000007 \text{ mol}$$

Para transformar las unidades de mol a g utilizamos el peso molecular del DPPH:

$$0,000007 \text{ mol} * 394,32 \text{ g/mol} = 2,76024 * 10^{-03} \text{ g de DPPH} = 2,76 \text{ mg de DPPH}$$

Se deben pesar 2,76 mg de DPPH y aforar a 100 mL de etanol para obtener el Estándar 1.

A partir del Estándar 1 se prepararon los demás estándares, para conocer el volumen a tomar se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_{E1}V_{E1} = C_{E2}V_{E2}$$

De donde:

C_{E1}: Concentración Estándar 1

V_{E1}: Volumen tomado de Estándar 1

C_{E2}: Concentración Estándar 2

V_{E2}: Volumen preparado de Estándar 2

$$V_{E1} = \frac{C_{E2} * V_{E2}}{C_{E1}}$$

$$V_{E1} = \frac{0,00006 \text{ mol/L} * 0,1 \text{ L}}{0,00007 \text{ mol/L}}$$

$$V_{E1} = 8,57 * 10^{-03} \text{ L}$$

$$V_{E1} = 8,57 \text{ mL}$$

Se aplica el mismo procedimiento para preparar los demás estándares:

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración del estándar	
			(mol/L)	(µg/mL)
1	-	100	0,00007	27,60
2	8,57	10	0,00006	23,66
3	7,14	10	0,00005	19,72
4	5,71	10	0,00004	15,77
5	4,29	10	0,00003	11,83
6	2,86	10	0,00002	7,89
7	1,43	10	0,00001	3,94
8	1,29	10	0,000009	3,55
9	1,07	10	0,000008	3,15
10	0,93	10	0,000007	2,76
11	0,86	10	0,000006	2,37
12	0,71	10	0,000005	1,97

Para transformar las unidades de la concentración del estándar de mol/L a µg/mL, se utiliza el peso molecular del DPPH:

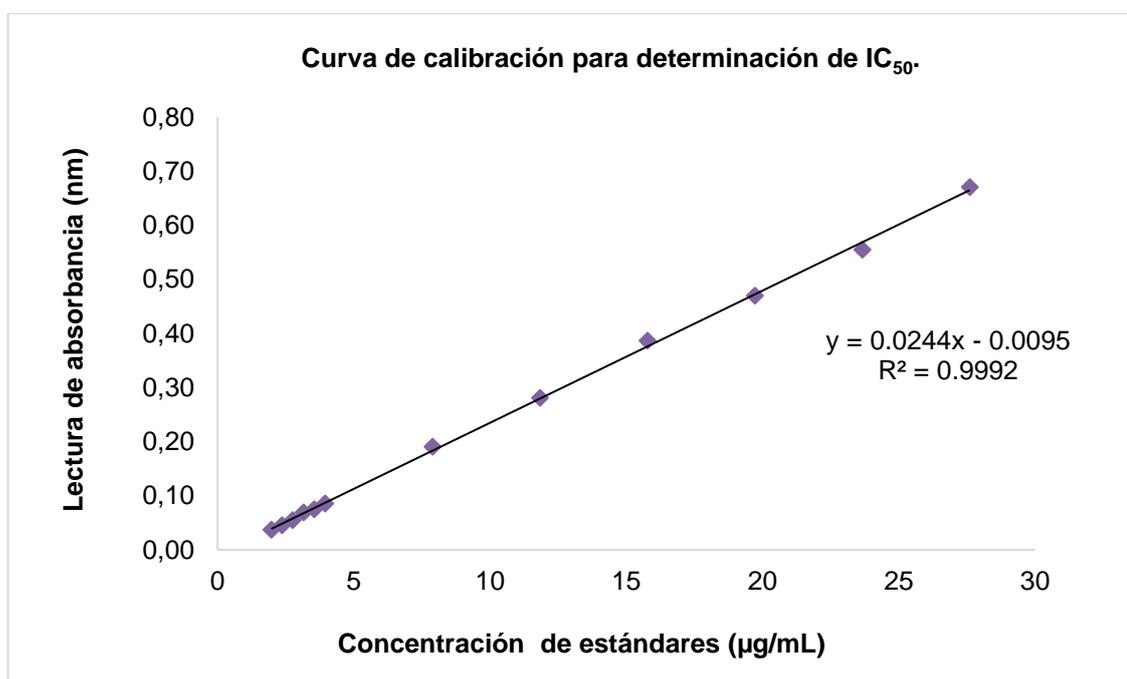
$$0,00007 \frac{\text{mol}}{\cancel{\text{L}}} * 394,32 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * \frac{1000000 \mu\text{g}}{1 \text{ g}} * \frac{1 \cancel{\text{L}}}{1000 \text{ mL}} = 27,602 \mu\text{g/mL}$$

F2. Curva de calibración

Se construyó la curva de calibración, graficando la concentración del estándar ($\mu\text{g/mL}$) en el eje X vs la absorbancia del estándar en el eje Y, cuyo coeficiente de correlación (R^2) debe ser mayor a 0,99.

Estándar	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración del estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias (nm)
1	-	100	27,60	0,670
2	8,57	10	23,66	0,555
3	7,14	10	19,72	0,470
4	5,71	10	15,77	0,386
5	4,29	10	11,83	0,281
6	2,86	10	7,89	0,191
7	1,43	10	3,94	0,086
8	1,29	10	3,55	0,075
9	1,07	10	3,15	0,069
10	0,93	10	2,76	0,055
11	0,86	10	2,37	0,046
12	0,71	10	1,97	0,037

Pendiente 0,0244
Intersección -0,0095
 R^2 0,9992
R 1,0000



F3. Cálculo de concentraciones preparadas de extracto

Las concentraciones preparadas de los extractos (Figura 5. literal f) se calcularon a partir de las concentraciones iniciales de éstos:

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Concentración inicial del extracto (µg/mL)
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	28655
		29100
		28850
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	28750
		28740
		28565

Fueron calculadas con la siguiente fórmula:

$$C_i V_i = C_1 V_1$$

De donde:

C_i : Concentración inicial del extracto

V_i : Volumen tomado del extracto

C_1 : Concentración 1 a calcular

V_1 : Volumen preparado concentración 1

Para éste ejemplo se tomará el valor de la primera muestra de etanol-agua (50:50 v/v):

$$C_1 = \frac{C_i V_i}{V_1}$$
$$C_1 = \frac{28655 \mu\text{g/mL} * 0,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$C_1 = 14327,50 \mu\text{g/mL}$$

Se realiza una corrección de volumen a cada concentración, multiplicándola por la alícuota que se tomó de la concentración para la lectura de absorbancias y dividiendo para el volumen final:

$$\text{Concentración 1} = 14327,50 \mu\text{g/mL} * (0,09 \text{ mL} / 3,6 \text{ mL})$$

$$\text{Concentración 1} = 358,187 \mu\text{g/mL}$$

La concentración 2, se determina de la siguiente manera:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

De donde:

C₁: Concentración 1

V₁: Volumen tomado de la concentración 1

C₂: Concentración 2 a calcular

V₂: Volumen preparado de la concentración 2

$$C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$C_2 = \frac{358,187 \mu\text{g/mL} * 0,5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$C_2 = 179,094 \mu\text{g/mL}$$

Se emplea el mismo procedimiento para calcular las demás concentraciones del extracto:

Concentración	Concentración calculada del extracto (μg/mL)
1	358,19
2	179,09
3	89,55
4	44,77
5	22,39
6	11,19
7	5,60

El mismo procedimiento fue aplicado para calcular las concentraciones de todos los extractos.

F4. Cálculos y resultados

Concentración de DPPH en el tiempo 0

Solución de trabajo	Absorbancia (nm)	Concentración de DPPH en el tiempo 0 (µg/mL)
1*	0,627	25,42
2**	0,613	24,87

*Se utilizó para los extractos etanol-agua (50:50 v/v) a 20°C

** Se utilizó para los extractos etanol-agua (50:50 v/v) a 40°C

Fue calculada mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

En este caso la ecuación de la recta es:

$$y = 0,0244x - 0,0095$$

De donde se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y + 0,0095}{0,0244}$$

Se reemplaza en (y) el valor de la absorbancia de la solución de trabajo DPPH, para este ejemplo se utiliza la absorbancia de la solución de trabajo 1:

$$x = \frac{0,627 + 0,0095}{0,0244}$$

$$x = 26,0724 \text{ µg/mL}$$

Se realiza una corrección de volumen, multiplicando (x) por la alícuota de solución de trabajo tomada para la lectura de absorbancias y dividiendo para el volumen total:

$$\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0} = 26,0724 \mu\text{g/mL} \cdot (3,51 \text{ mL} / 3,6 \text{ mL})$$

$$\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0} = 25,4206 \mu\text{g/mL}$$

El mismo procedimiento fue aplicado para determinar la concentración de DPPH en el tiempo 0 de las dos soluciones de trabajo utilizadas.

Concentración de DPPH en el tiempo t y % de inhibición de DPPH

Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Concentración calculada del extracto (µg/mL)	Absorbancia (nm)*	Concentración de DPPH en el tiempo 0 (µg/mL)	Concentración de DPPH en el tiempo t (mol/L)	% Inhibición de DPPH
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	358,19	0,028	25,42	-	-
		179,09	0,060		0,0000072	11,26
		89,55	0,222		0,0000241	37,38
		44,77	0,411		0,0000436	67,74
		22,39	0,495		0,0000524	81,39
		11,19	0,551		0,0000582	90,42
		5,60	0,589		0,0000622	96,55
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	363,75	0,031	25,42	-	-
		181,88	0,056		0,0000068	10,51
		90,94	0,255		0,0000275	42,64
		45,47	0,391		0,0000416	64,62
		22,73	0,500		0,0000529	82,20
		11,37	0,552		0,0000583	90,53
		5,68	0,583		0,0000615	95,47
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	357,06	0,030	25,42	-	-
		178,53	0,050		0,0000061	9,53
		89,27	0,210		0,0000228	35,37
		44,63	0,366		0,0000389	60,45
		22,32	0,473		0,0000501	77,75
		11,16	0,516		0,0000546	84,73
		5,58	0,550		0,0000581	90,21
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	359,37	0,038	24,87	-	-
		179,69	0,048		0,0000059	9,42
		89,84	0,194		0,0000212	33,58
		44,92	0,390		0,0000415	65,82
		22,46	0,465		0,0000493	78,18
		11,23	0,492		0,0000520	82,57
		5,62	0,518		0,0000548	86,91
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	359,25	0,042	24,87	-	-
		179,63	0,046		0,0000057	9,09
		89,81	0,197		0,0000214	33,97
		44,91	0,381		0,0000405	64,28
		22,45	0,477		0,0000505	80,16
		11,23	0,510		0,0000539	85,54
		5,61	0,530		0,0000560	88,83
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	357,06	0,038	24,87	-	-
		178,53	0,043		0,0000054	8,60
		89,27	0,211		0,0000229	36,38
		44,63	0,372		0,0000396	62,86
		22,32	0,485		0,0000514	81,53
		11,16	0,499		0,0000528	83,73
		5,58	0,529		0,0000559	88,72

*Se trabajó con las absorbancias que se encontraron dentro del rango de absorbancias de la curva de calibración.

La concentración de DPPH en el tiempo t fue calculada mediante un retroceso, iniciado con la ecuación de la recta dada por la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = absorbancia (nm)

m = pendiente

x = concentración

b = intersección

En este caso la ecuación de la recta es:

$$y = 0,0244 x - 0,0095$$

Se despeja la concentración (x):

$$x = \frac{y+0,0095}{0,0244}$$

Se reemplaza en (y) los valores de las absorbancias de las concentraciones preparadas del extracto, para este ejemplo se utiliza los datos de la primera muestra de etanol-agua (50:50 v/v):

$$x = \frac{0,060 + 0,0095}{0,0244}$$

$$x = 2,8620 \mu\text{g/mL (Concentración de DPPH en el tiempo t)}$$

Para calcular el % de inhibición de DPPH se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo (t) (mol/L)}}{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 (mol/L)}} * 100$$

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = \frac{2,8620 \mu\text{g/mL}}{25,420594 \mu\text{g/mL}}$$

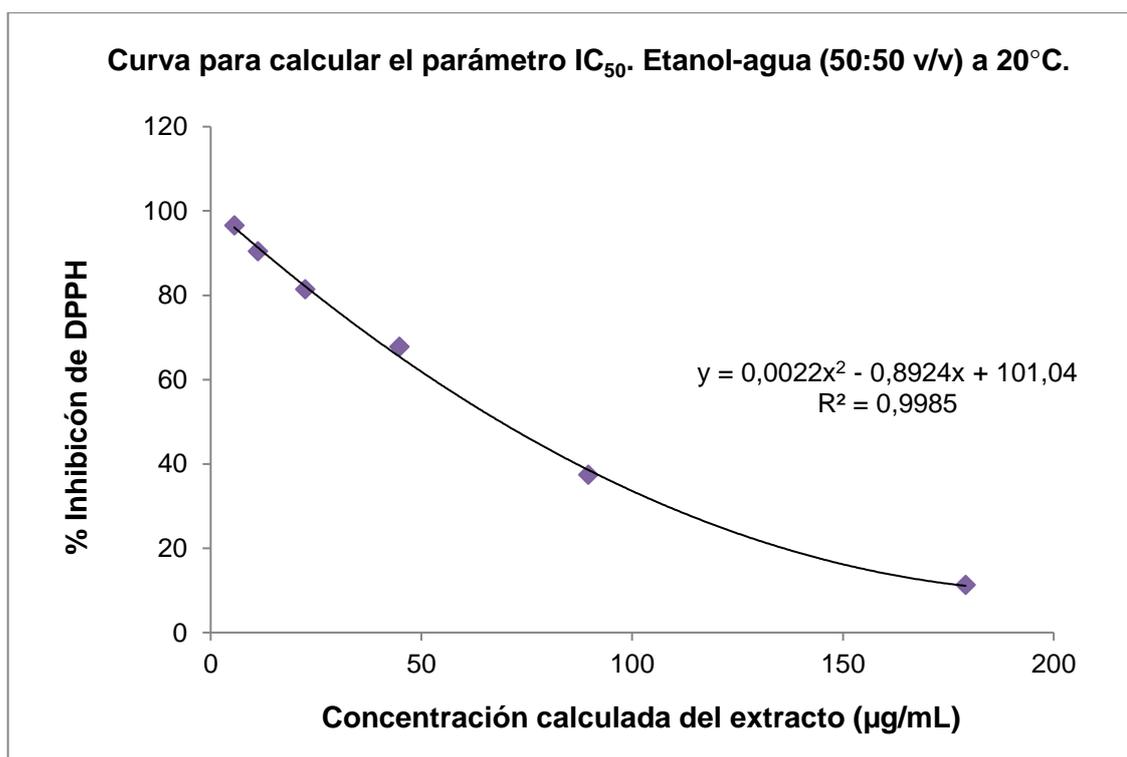
$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = 11,259$$

Se aplicó el mismo procedimiento para todas las muestras analizadas.

Determinación del parámetro IC₅₀ y AAI

Para calcular el IC₅₀ se trabaja con un mínimo de seis concentraciones, cuyas absorbancias deben estar dentro del rango de la curva de calibración. Se graficó en el eje x la concentración calculada del extracto y en el eje y el % de inhibición de DPPH de cada concentración, para éste ejemplo tomaremos los valores del primer extracto obtenido por etanol-agua (50:50 v/v) a 20°C:

Concentración calculada del extracto (µg/mL)	% Inhibición de DPPH
179,09	11,26
89,55	37,38
44,77	67,74
22,39	81,39
11,19	90,42
5,60	96,55



De la curva graficada se obtiene una ecuación polinómica:

$$y = ax^2 + bx + c$$

En éste caso es:

$$y = 0,0022x^2 - 0,8924x + 101,04$$

Por definición IC_{50} es la concentración necesaria de extracto para disminuir en 50% la concentración de DPPH, entonces (y) toma el valor de 50. A partir de la ecuación dada se despeja x:

$$x (IC_{50}) = 68,90 \mu\text{g/mL}$$

Para calcular el AAI se utiliza la siguiente fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentración de DPPH en el tiempo 0 } (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} (\mu\text{g/mL})}$$

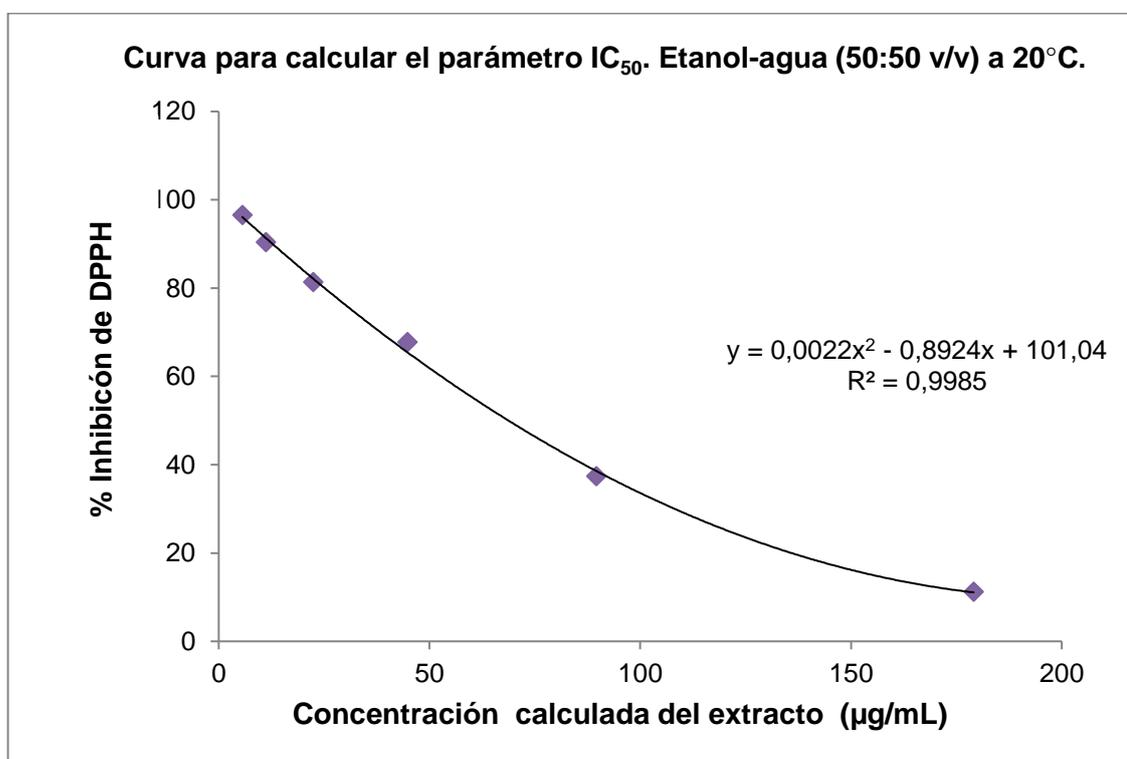
$$AAI = \frac{25,39 \mu\text{g/mL}}{68,90 \mu\text{g/mL}}$$

$$AAI = 0,3685431$$

IC₅₀ y AAI de extractos obtenidos por etanol-agua (50:50 v/v) a 20°C

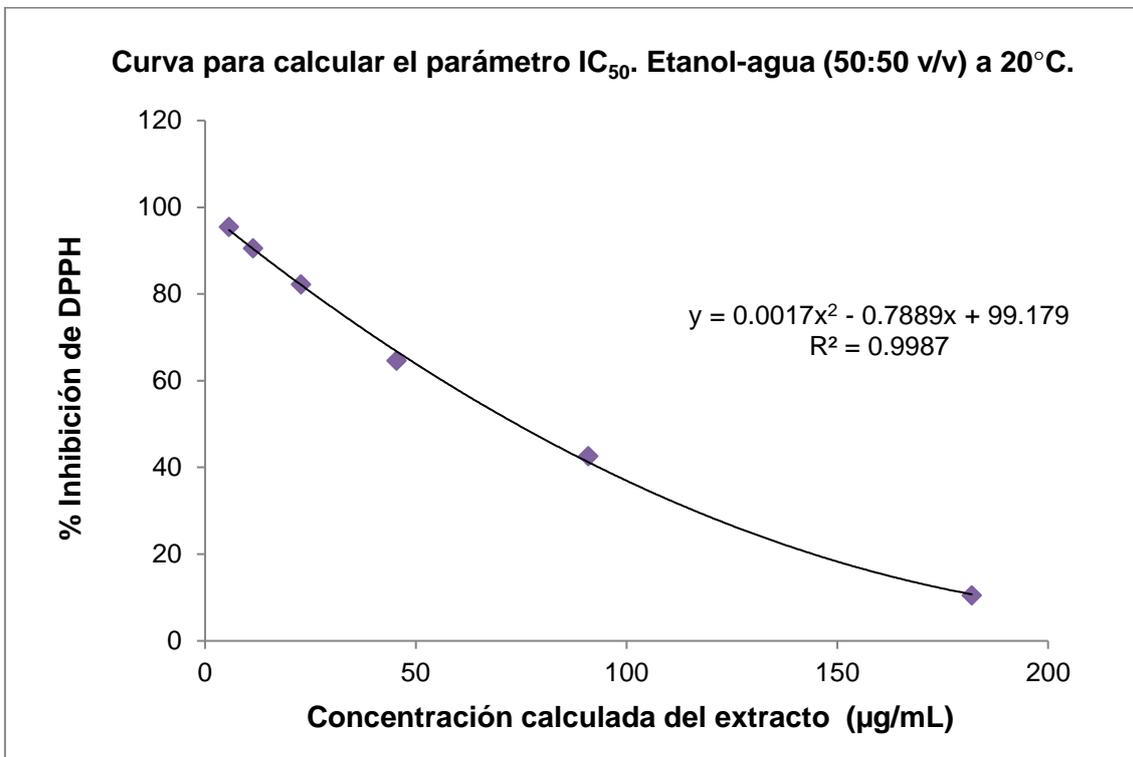
1.

Concentración calculada del extracto (µg/mL)	% Inhibición de DPPH
179,09	11,26
89,55	37,38
44,77	67,74
22,39	81,39
11,19	90,42
5,60	96,55



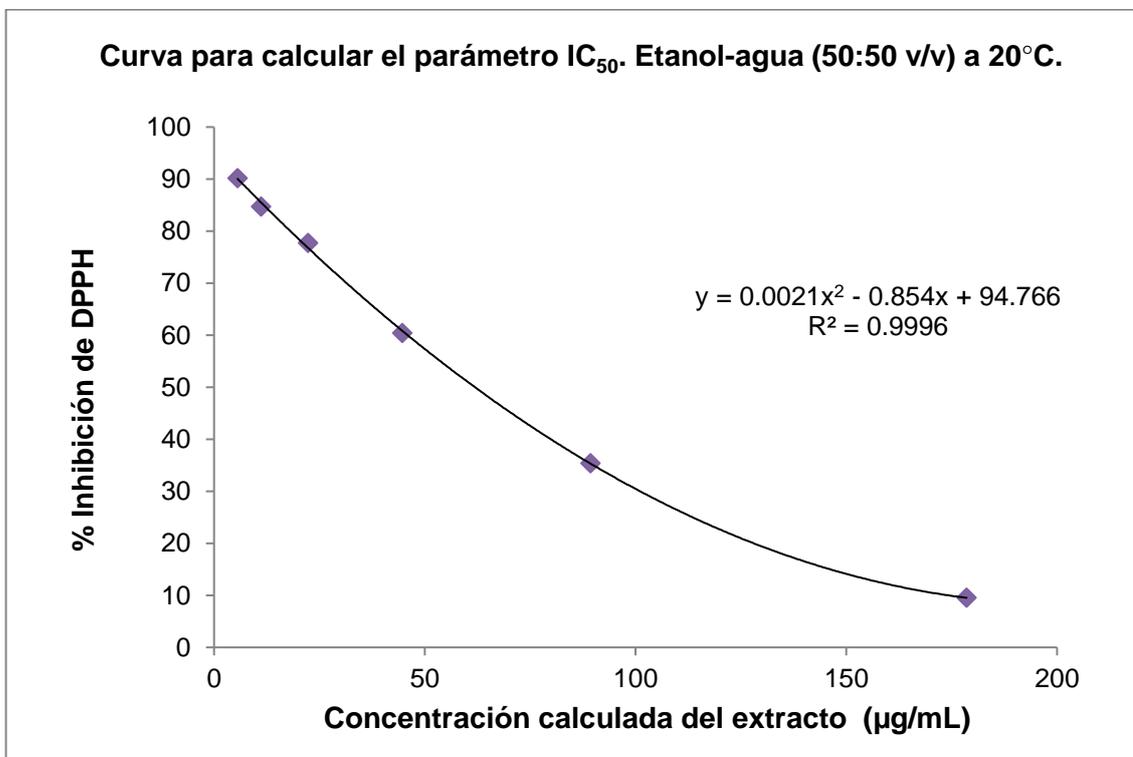
2.

Concentración calculada del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibición de DPPH
181,88	10,51
90,94	42,64
45,47	64,62
22,73	82,20
11,37	90,53
5,68	95,47



3.

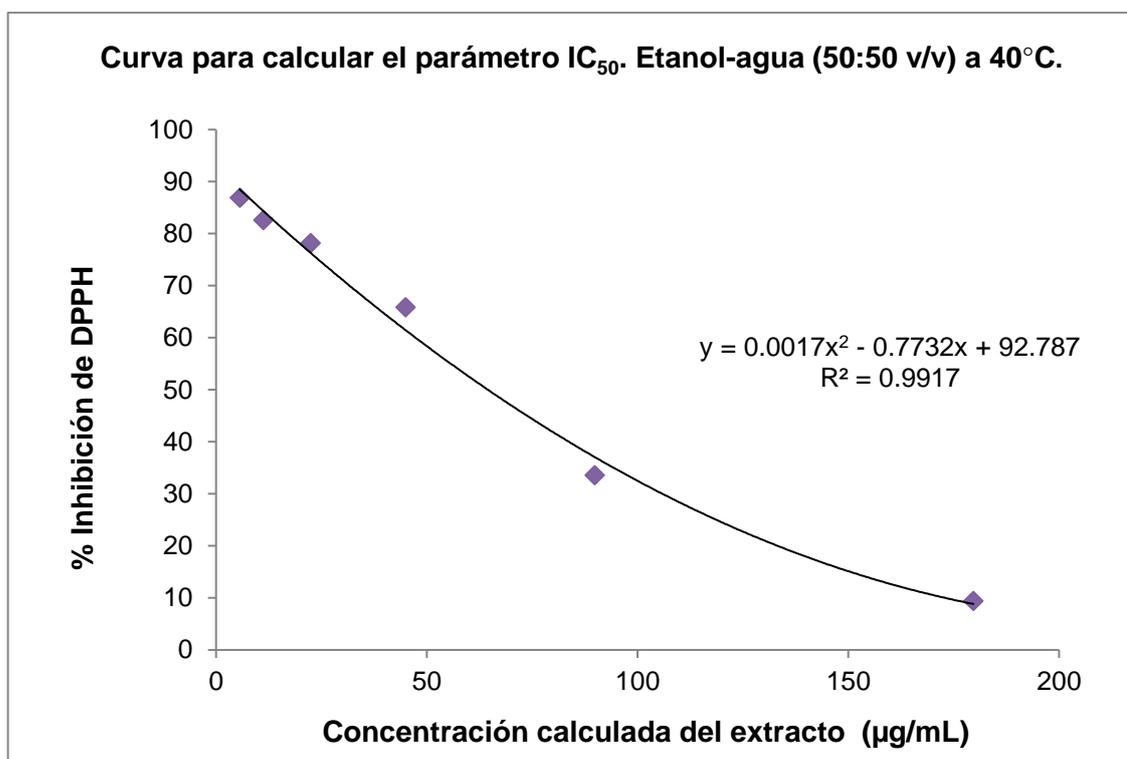
Concentración calculada del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibición de DPPH
178,53	9,53
89,27	35,37
44,63	60,45
22,32	77,75
11,16	84,73
5,58	90,21



IC₅₀ y AAI de extractos obtenidos por etanol-agua (50:50 v/v) a 40°C

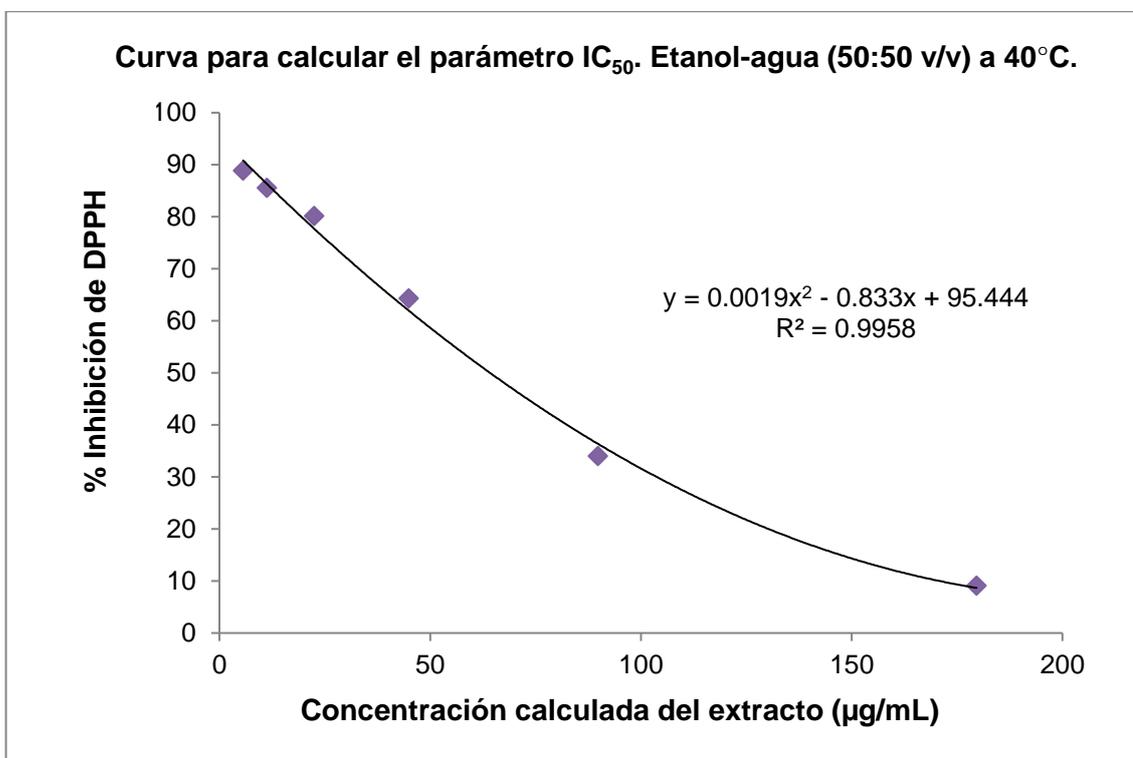
1.

Concentración calculada del extracto (µg/mL)	% Inhibición de DPPH
179,69	9,42
89,84	33,58
44,92	65,82
22,46	78,18
11,23	82,57
5,62	86,91



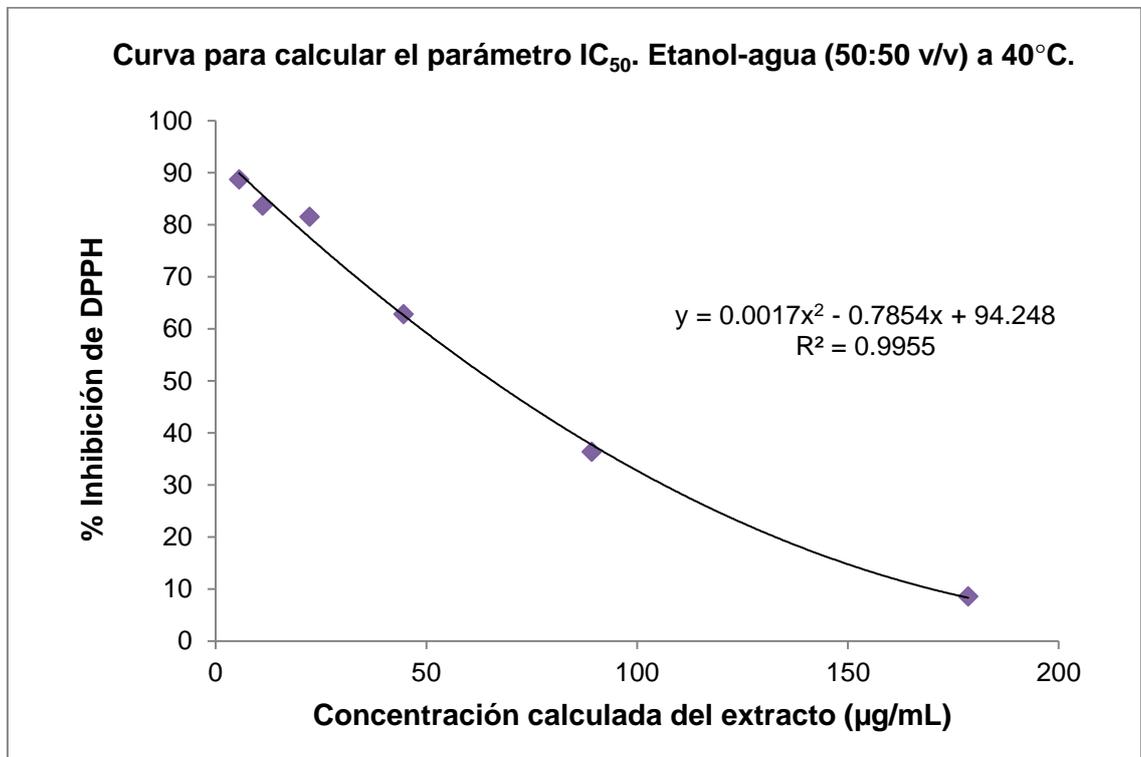
2.

Concentración calculada del extracto (µg/mL)	% Inhibición de DPPH
179,63	9,09
89,81	33,97
44,91	64,28
22,45	80,16
11,23	85,54
5,61	88,83



3.

Concentración calculada del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibición de DPPH
178,53	8,60
89,27	36,38
44,63	62,86
22,32	81,53
11,16	83,73
5,58	88,72



IC₅₀ y AAI de extractos analizados:

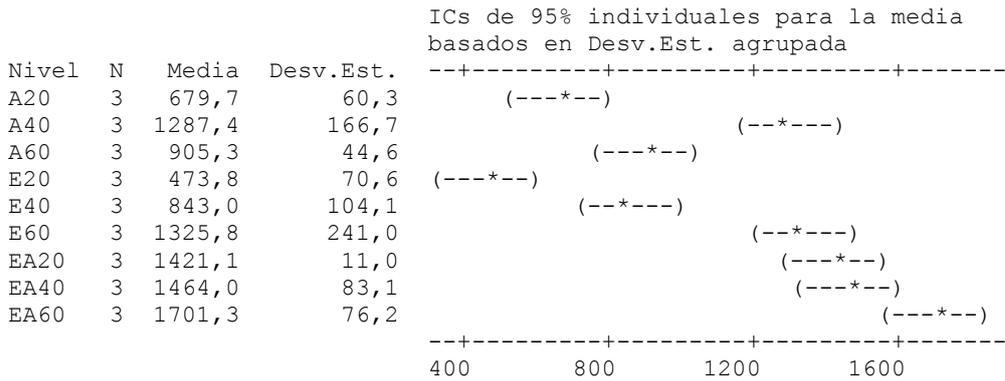
Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	IC₅₀ (µg/mL)	AAI
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	68,90	0,37
		74,20	0,34
		61,82	0,41
Etanol-agua (50:50 v/v)	40	66,25	0,38
		63,85	0,39
		65,67	0,38

Anexo G. Análisis estadístico

G1. ANOVA unidireccional: Fenoles mg EAG/100 g muestra BS vs. Muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
muestra	8	4054823	506853	37,96	0,000
Error	18	240329	13352		
Total	26	4295152			

S = 115,5 R-cuad. = 94,40% R-cuad. (ajustado) = 91,92%



Desv.Est. agrupada = 115,5

Agrupar información utilizando el método de Tukey

muestra	N	Media	Agrupación
EA60	3	1701,3	A
EA40	3	1464,0	A B
EA20	3	1421,1	A B
E60	3	1325,8	B
A40	3	1287,4	B
A60	3	905,3	C
E40	3	843,0	C
A20	3	679,7	C D
E20	3	473,8	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de muestra

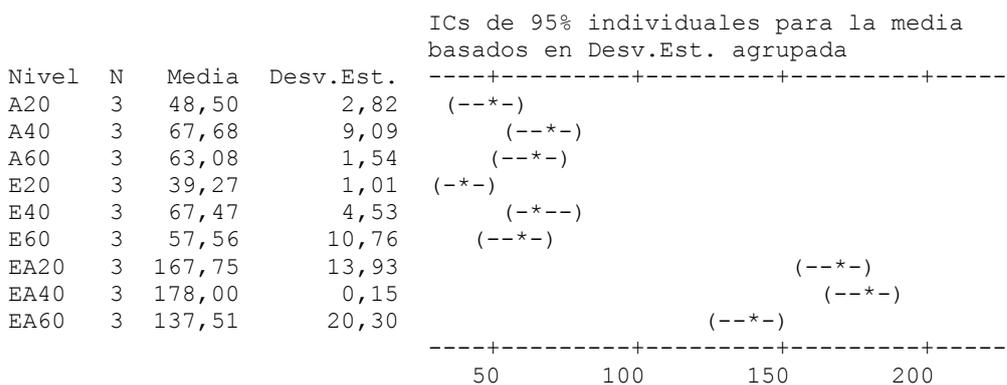
Nivel de confianza individual = 99,75%

muestra = A20 restado de:

G2. ANOVA unidireccional: DPPH μM ET/ g muestra BS vs. muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
muestra	8	69283,7	8660,5	93,17	0,000
Error	18	1673,1	92,9		
Total	26	70956,8			

S = 9,641 R-cuad. = 97,64% R-cuad.(ajustado) = 96,59%



Desv.Est. agrupada = 9,64

Agrupar información utilizando el método de Tukey

muestra	N	Media	Agrupación
EA40	3	178,00	A
EA20	3	167,75	A
EA60	3	137,51	B
A40	3	67,68	C
E40	3	67,47	C
A60	3	63,08	C D
E60	3	57,56	C D
A20	3	48,50	C D
E20	3	39,27	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de muestra

Nivel de confianza individual = 99,75%

G3. ANOVA unidireccional: FRAP μM ET/g muestra BS vs. muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
muestra	8	26013,8	3251,7	68,45	0,000
Error	18	855,1	47,5		
Total	26	26868,9			

S = 6,892 R-cuad. = 96,82% R-cuad. (ajustado) = 95,40%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
A20	3	41,82	2,55	(--*--)
A40	3	63,40	5,77	(--*--)
A60	3	58,61	4,32	(--*--)
E20	3	24,96	0,74	(-***)
E40	3	69,68	1,20	(--*--)
E60	3	71,71	3,04	(--*--)
EA20	3	122,14	12,85	(--*--)
EA40	3	118,73	9,57	(--*--)
EA60	3	97,23	10,06	(-***)

-----+-----+-----+-----+-----
 30 60 90 120

Desv.Est. agrupada = 6,89

Agrupar información utilizando el método de Tukey

muestra	N	Media	Agrupación
EA20	3	122,14	A
EA40	3	118,73	A
EA60	3	97,23	B
E60	3	71,71	C
E40	3	69,68	C
A40	3	63,40	C
A60	3	58,61	C D
A20	3	41,82	D E
E20	3	24,96	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de muestra

Nivel de confianza individual = 99,75%

G4. ANOVA unidireccional: IC₅₀ µg/mL vs. muestra

Fuente	GL	SC	CM	F	P
muestra	1	13,9	13,9	0,69	0,452
Error	4	80,4	20,1		
Total	5	94,3			

S = 4,483 R-cuad. = 14,76% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
EA20	3	68,305	6,215	(-----*-----)
EA40	3	65,259	1,250	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
60,0 65,0 70,0 75,0

Desv.Est. agrupada = 4,483

Agrupar información utilizando el método de Tukey

muestra	N	Media	Agrupación
EA20	3	68,305	A
EA40	3	65,259	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de muestra

Nivel de confianza individual = 95,00%

