



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

TITULACIÓN DE INGENIERA EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

**Potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales de mango**  
**(*Mangifera indica* L.)**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Jara Muñoz, Silvia Patricia

DIRECTOR: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny, Mg Sc.

LOJA - ECUADOR

2014

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Mg. Sc.

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “**Potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales del mango (*Mangifera indica. L*)**” realizado por **Jara Muñoz Silvia Patricia**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2014.

f).....

**Mg. Sc. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado**

**C.I.**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Silvia Patricia Jara Muñoz declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales del mango (*Mangifera indica*. L), de la Titulación de Ingeniería en Industrias Agropecuarias, siendo el Mg. Sc. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, director 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. 67 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

Loja, marzo de 2014

f).....

**Jara Muñoz Silvia Patricia**

**CI: 110376573-9**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis a la persona más importante, a ti mami con mucho cariño porque has dedicado cada minuto para enseñarme a salir adelante siempre, por tu apoyo incondicional, por tu gran paciencia, tu cariño, por enseñarme tus virtudes que me guían en la vida, por todo esto y mucho más, gracias mami.

*Silvia Jara Muñoz*

## **AGRADECIMIENTO**

Le doy gracias a Dios por guiarme en cada momento.

A mi hermana Jessica, a mis tíos Eugenia, Arturo, Franco y Galo a mis primos por su apoyo y cariño brindado.

Mi agradecimiento sincero a la Universidad Técnica Particular de Loja, a través del Ing. Geovanny Figueroa por su apoyo, orientación, conocimientos impartidos y profesionalismo brindado para la realización de este trabajo.

A todos los docentes por su constante colaboración, siendo parte de mi formación profesional.

A mis amigos Martín, Patricia y Claudia por su tiempo, sabios consejos y por su complicidad. Finalmente a mis compañeros: Verónica, Veránea, Diego, Diana y Gabriela por brindarme su amistad y apoyo en cada momento.

*Silvia Jara Muñoz*

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>Pág.</b>
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1 El mango	5
1.2 Sub-producto	5
1.3 Antioxidante	6
1.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	7
1.4.1 Componentes del HPLC	10
1.4.1.1 Sistema de Bombeo	10
1.4.1.2 Sistema de Inyección	11
1.4.1.3 La columna cromatográfica	11
1.4.1.4 Sistema de Detección	12
1.5 Características y parámetros de calidad del método analítico	13
1.5.1 Linealidad	13
1.5.2 Precisión	13
1.5.3 Exactitud	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivo específico	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Implementación del método cromatográfico	18
3.1.1 Identificación de compuestos fenólicos	18
3.1.2 Mejorar resolución	18
3.1.3 Linealidad	19

3.1.4 Precisión	19
3.1.5 Exactitud	19
3.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Implementación del método cromatográfico	23
4.1.1 Identificación de compuestos fenólicos	23
4.1.2 Mejorar resolución	26
4.1.3 Linealidad	29
4.1.4 Precisión	36
4.1.5 Exactitud	36
4.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos	37
4.2.1 Definir la concentración de extractos	37
4.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos	39
4.2.2.1 Ácido gálico	39
4.2.2.2 Mangiferina	41
4.2.2.3 Quercetina	43
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	52

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
<b>Gráfica 1.</b> Compuestos mayoritarios en los subproductos de mango	7
<b>Gráfica 2.</b> Cuantificación del ácido gálico con el método de maceración dinámica	40
<b>Gráfica 3.</b> Cuantificación de mangiferina con el método de maceración dinámica	42
<b>Gráfica 4.</b> Cuantificación de quercetina con el método de maceración dinámica	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Componentes del sistema HPLC	9
<b>Figura 2.</b> Bomba recíproca de HPLC	10
<b>Figura 3.</b> Columna cromatográfica	11
<b>Figura 4.</b> Detector de arreglo de diodos	12
<b>Figura 5.</b> Espectro UV de los compuestos fenólicos. a) Espectro UV estándares, (b) Espectro UV extractos (c) Espectro UV bibliografía	25
<b>Figura 6.</b> Elución de compuestos fenólicos con la gradiente de Nantitanon	26
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas de las variaciones de elución	28
<b>Figura 8.</b> Curva de calibración de ácido gálico, mangiferina, epicatequina y quercetina	31
<b>Figura 9.</b> Residuos de las linealidades para cada compuesto fenólicos	33
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de los compuestos fenólicos en su orden de elución	35
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas de ácido gálico, mangiferina y quercetina con las concentraciones de extracto experimentadas	38

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Rangos lineales de los compuestos fenólicos	13
<b>Tabla 2.</b> Gradiente del método	19
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de obtención de los extractos con el método de maceración dinámica	20
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de obtención de los extractos por el método Soxhlet	21
<b>Tabla 5.</b> Variaciones en la gradiente	27
<b>Tabla 6.</b> Calibración de las curvas de los compuestos fenólicos	30
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes de variación de las áreas de los compuestos fenólicos	36
<b>Tabla 8.</b> Contenido de ácido gálico con el método Soxhlet	40
<b>Tabla 9.</b> Contenido de mangiferina con el método Soxhlet	42
<b>Tabla 10.</b> Contenido de quercetina con el método Soxhlet	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

<b>Anexo 1.</b> Diagrama de flujo del método	52
<b>Anexo 2.</b> Condiciones del método cromatográfico	54
<b>Anexo 3.</b> Preparación de estándares	55
<b>Anexo 4.</b> Linealidades de compuestos fenólicos	57
<b>Anexo 5.</b> Cálculos de resolución	63
<b>Anexo 6.</b> Linealidad para lectura de extractos	64
<b>Anexo 7.</b> Cálculos de exactitud	65
<b>Anexo 8.</b> Cálculos señal - ruido	66
<b>Anexo 9.</b> Nomenclatura asignada a los extractos	67
<b>Anexo 10.</b> Determinación de ácido gálico en los subproductos de mango	68
<b>Anexo 11.</b> Cálculos de los extractos de ácido gálico, mangiferina y quercetina	76
<b>Anexo 12.</b> Análisis estadístico de ácido gálico	77
<b>Anexo 13.</b> Análisis estadístico de ácido gálico con respecto al método de extracción	78
<b>Anexo 14.</b> Determinación de mangiferina en los subproductos de mango	79
<b>Anexo 15.</b> Análisis estadístico de mangiferina	87
<b>Anexo 16.</b> Análisis estadístico de mangiferina con respecto al método de extracción	88
<b>Anexo 17.</b> Determinación de quercetina en los subproductos de mango	89
<b>Anexo 18.</b> Análisis estadístico de quercetina	97
<b>Anexo 19.</b> Análisis estadístico de quercetina con respecto al método de extracción	98

## LISTA DE ABREVIATURAS

**cm:** centímetro

**C.V:** coeficiente de variación

**EtOH:** Etanol absoluto

**g:** gramos

**h:** horas

**kg:** kilogramo

**L:** litro

**MeOH:** Metanol

**mg:** miligramo

**min:** minutos

**mL:** mililitro

**mm:** milímetro

**nm:** nanómetro

**ms:** materia seca

**ppm:** partes por millón

**Tm:** tonelada métrica

**T<sub>R</sub>:** tiempo de retención

**µg:** microgramo

**µL:** microlitro

**µm:** micrómetro

**UV:** Ultra Violeta

**v/v:** volumen

**w:** peso

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue cuantificar mediante cromatografía de líquidos de alta resolución la concentración de ácido gálico, mangiferina, epicatequina y quercetina en 120 extractos de subproductos de mango obtenidos mediante maceración dinámica y Soxhlet. Los analitos fueron separados con una mezcla de solventes: ácido acético – agua en proporción (2:98, v/v) como fase A y la mezcla (0,5:95,5 v/v) ácido acético – agua con acetonitrilo en proporción (50:50, v/v) como fase B, utilizando una columna C18. La concentración de ácido gálico estuvo entre 140 y 1471 mg/kg ms, mangiferina entre 14 y 166 mg/kg ms, quercetina entre 20 y 96 mg/kg ms y no fue detectada epicatequina. El mejor método de extracción fue Soxhlet debido a que emplea menor tiempo.

**Palabras clave:** HPLC, ácido gálico, mangiferina, epicatequina, quercetina y subproductos de mango.

## ABSTRACT

The objective of this study was to quantify gallic acid, mangiferin, epicatechin and quercetin concentration by high performance liquid chromatography of 120 extracts obtained by dynamic maceration and Soxhlet method of mango byproducts. The analytes were separated with a mixture of solvents: acetic acid - water ratio (2:98, v/v) as phase A and the mixture (0,5:95,5 v/v) acetic acid - water with acetonitrile ratio (50:50, v/v) as phase B, using a C18 column. Gallic acid concentration was between 140 to 1471 mg/kg dm, mangiferin between 14 to 166 mg/kg dm, quercetin between 20 to 96 mg/kg dm and epicatechin was not detected. The best extraction method was Soxhlet because it use less time.

**Keywords:** HPLC, gallic acid, mangiferin, epicatechin, quercetin and mango byproducts.

## INTRODUCCIÓN

La industria de procesamiento de frutas genera un elevado porcentaje de subproductos como cáscaras, semillas y restos de pulpa en sus diferentes etapas de procesamiento, en ciertas ocasiones los compuestos bioactivos de los subproductos se encuentran en similar o mayor contenido que en el producto final (Ayala-Zavala et al. 2011). Los subproductos del mango representan entre el 35 – 60% de la fruta (Gourgue et al. 1992), sabiendo que el rendimiento promedio por hectárea de producción oscila entre 7 y 15 Tm aproximadamente (Comité Técnico Regional 2007) y en Ecuador se cosecha mango de 2 a 3 veces al año (El Agro 2013). De la producción destinada para el consumo local está generándose aproximadamente 10800 Tm al año de subproductos, los mismos que no son aprovechados (Fundación Mango Ecuador 2000).

El aprovechamiento de los subproductos benefician a la industria ya que permite obtener ingresos de la utilización de los subproductos y beneficia a los consumidores por el excelente valor nutritivo (Goñi y Hervert-Hernández 2011). Los usos principales que la industria da a los subproductos son como fuente de antioxidantes, aromatizantes, colorantes, aditivos alimentarios entre otros (Ayala-Zavala et al. 2011). En la piel, semillas y hojas del mango se han cuantificado compuestos fenólicos como: mangiferina, ácido gálico (Barreto et al. 2008), quercetina (Ribeiro et al. 2008) y epicatequina (Nuñez Sellés et al. 2002), los polifenoles son compuestos bioactivos que tienen propiedades antivirales, anti-inflamatorios, antialérgicos, anti-mutagénicos, anticancerígenos, anti-colesterolémicos y antioxidantes (Sánchez-Moreno 2002).

El Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos busca extraer compuestos con capacidad antioxidante a partir de subproductos de mango, por lo que el presente trabajo tiene la finalidad de cuantificar ácido gálico, mangiferina, epicatequina y quercetina en extractos obtenidos a partir de estos subproductos.

## **1. REVISIÓN DE LITERATURA**

## **1.1 El mango**

El mango (*Mangifera indica* L.) pertenece a la familia de Anacardiaceae, esta fruta es originaria de la India y el Sudeste Asiático, en la India estas frutas han sido cultivadas por más de 4000 años y fue en el siglo 16 cuando se distribuyó alrededor del mundo, llegando en el siglo 18 a América. Su cultivo se da en las áreas subtropicales y tropicales del mundo (Crane y Campbell 1994). El mango es una fruta de alto valor nutritivo ya que contiene vitaminas y minerales esenciales para cubrir en un gran porcentaje los requerimientos de la dieta diaria (Griesbach 2003).

El mango es una fruta tropical muy comercializada después del aguacate y banano (Ureña Bogantes et al. 2007), dentro de las principales variedades rojas cultivadas para exportación a nivel mundial es Tommy Atkins (Griesbach 2003), con esta variedad se trabajó en esta investigación; ésta presenta algunas características como un tamaño mediano hasta 13 cm de largo y pesa hasta 1200 g, con un promedio de 475 g, tiene forma ovalada a oblonga, su color base es anaranjado amarillo y el rubor es de rojo oscuro a rojo brillante; la superficie de la fruta es lisa, la cáscara es gruesa y resistente al daño mecánico, su pulpa es amarilla oscura con una textura firme debido a la presencia de abundantes fibras finas, pero sujetas a descomposición fisiológica. El endocarpio es pequeño y constituye sólo 6 a 7% del peso de la fruta (Ureña Bogantes et al. 2007).

Con respecto a la producción los mayores productores de mango son India, China y Tailandia durante el periodo 2003 – 2005. Por otro lado México, Brasil, Perú, Ecuador, Haití son proveedores principales de mango para Norteamérica (Evans 2008). Si aproximadamente 7700 ha son destinadas al cultivo de mango en nuestro país se obtienen 77000 Tm de mango (Fundación Mango Ecuador 2000).

## **1.2 Sub-producto**

La FAO (2009) define al subproducto como “el producto secundario derivado de un proceso de fabricación, reacción química o ruta bioquímica que no es el producto o servicio principal que se está produciendo”.

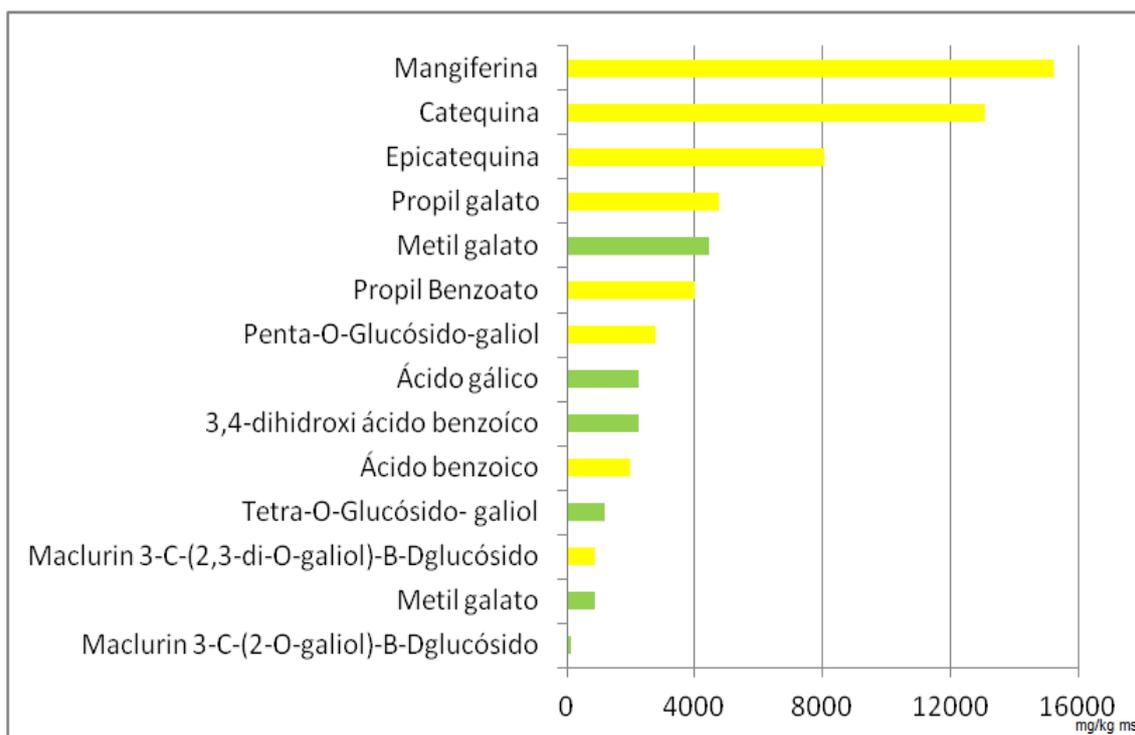
Los subproductos del mango constituyen del 35 al 60% del peso de la fruta (Gourgue et al. 1992). Específicamente la piel constituye entre 11 al 20% de peso de fruta fresca (Ajila et al. 2010, Ayala-Zavala et al. 2010), presentando una alta concentración de compuestos bioactivos con potencial antioxidante (Ajila et al. 2010). La semilla

constituye el 13,5% y pulpa adherida a la piel el 17,9% del total de la fruta (Ayala-Zavala et al. 2010).

Los subproductos de las frutas tropicales pueden utilizarse como aditivos alimentarios: antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes y espesantes (Ayala-Zavala et al. 2011).

### **1.3 Antioxidante**

En muchas de las reacciones metabólicas en las que interviene el oxígeno se da la producción de radicales libres, dicha producción es responsable de patologías como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y otras más; la defensa del organismo contra los radicales libres son los antioxidantes (Cervera et al. 2004). Los antioxidantes son “sustancias que cuando están presentes en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, significativamente retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato” Halliwell citado por (Venereo Gutiérrez 2002). Los antioxidantes se clasifican en endógenos, los mismos que se generan en el organismos y antioxidantes exógenos que son proporcionados por los alimentos (vitaminas, minerales, compuestos fenólicos) (Cervera et al. 2004). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y actúan como defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por agentes patógenos (Manach et al. 2004), los compuestos fenólicos tienen potentes propiedades antioxidantes que previenen enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer (Dai y Mumper 2010). Estos compuestos están formados por un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilo, siendo la estructura, el número, las posiciones de los grupos hidroxilo y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos, los aspectos de los que depende su actividad antioxidante (Balasundram et al. 2006). En la Gráfica 1 se presentan los principales compuestos con capacidad antioxidante en los subproductos de mango.



**Gráfica 1.** Compuestos mayoritarios en los subproductos de mango.

**Fuente:** ● (Barreto et al. 2008) ● (Nuñez Sellés et al. 2002)

**Elaboración:** La autora

#### 1.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

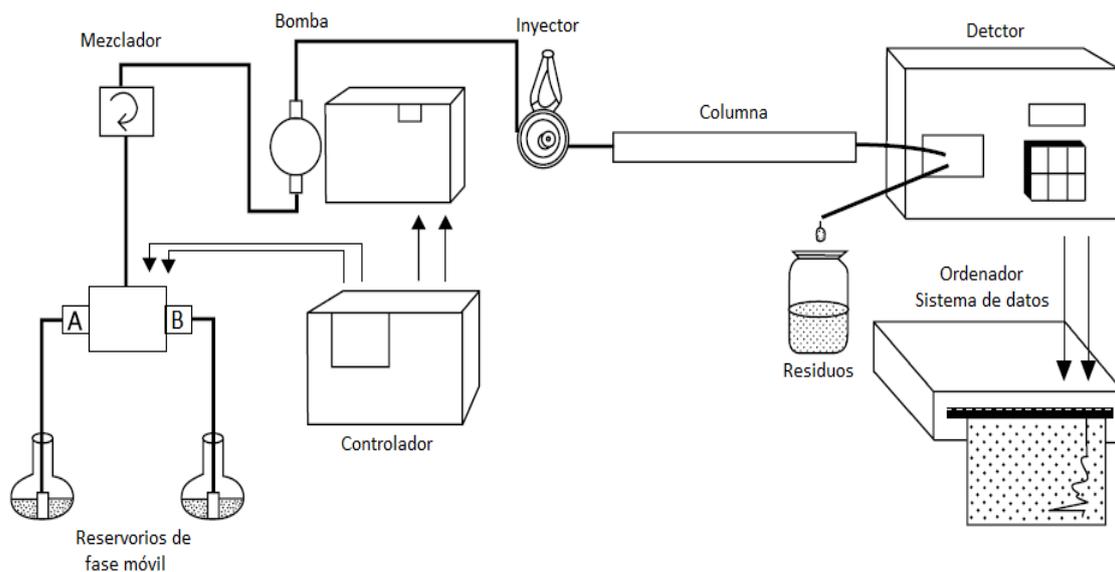
La cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) permite separar compuestos de pesos moleculares entre 54 a 450.000 Daltons, se puede utilizar este tipo de cromatografía para compuestos volátiles o estables térmicamente (McMaster 2007); las ventajas que presenta HPLC son: alta sensibilidad de detección, recuperación de la muestra cuantitativa, susceptibilidad a diversas muestras, rápido y preciso (Dong 2006). Es ampliamente utilizado por ejemplo para la cuantificación de ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, azúcares, nitrosaminas, pesticidas, ácidos grasos, aflatoxinas, pigmentos y ciertos aditivos alimentarios (Nielsen 2003).

En lo referente a los tipos de cromatografía existen varias clasificaciones, de acuerdo al mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria se clasifican en: cromatografía de reparto, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad y cromatografía de adsorción (Harris 2007).

La cromatografía de adsorción o de fase reversa, es muy utilizada debido a que es menos sensible a impurezas polares como el agua que puedan existir en el eluyente,

se utiliza una fase estacionaria apolar y fase móvil un solvente polar (Skoog et al. 2001, Harris 2007). En estas condiciones los analitos polares eluyen primero (Dong 2006).

Para realizar la separación de los antioxidantes utilizando HPLC se inicia con la inyección de la muestra. Los componentes que son retenidos fuertemente por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil y los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria eluyen con rapidez (Skoog et al. 2001), los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil en la columna cromatográfica (Dong 2006); dicha fase es impulsada por el sistema de bombeo (McMaster 2007), es decir el reparto de los solutos entre cualquiera de las fases móvil o estacionaria da lugar a la separación (Harris 2007). La diferencia de velocidades hace que se separen los componentes en bandas o zonas que se extienden a lo largo de la columna; haciendo pasar suficiente fase móvil a través de la columna se consigue un aislamiento de los compuestos hasta que las bandas individuales salgan de la columna, pudiendo ser detectados a diferentes tiempos de retención y obteniéndose una representación gráfica denominada cromatograma (Skoog et al. 2001). La banda de un soluto se ensancha a medida que atraviesa la columna cromatográfica, el ensanchamiento de la banda se da por la difusión, la misma que depende de la velocidad con la que se mueve una sustancia desde una región de mayor a menor concentración (Harris 2007), este ensanchamiento es inevitable, pero se puede encontrar las condiciones apropiadas para que el ensanchamiento ocurra más lentamente que la separación de las bandas (Skoog et al. 2001). En la Figura 1 se muestra un esquema de los componentes del sistema HPLC.



**Figura 1.** Componentes del sistema HPLC

**Fuente:** (McMaster 2007).

**Elaboración:** La autora

La resolución se define como medida cuantitativa de separación de dos analitos (Skoog et al. 2001). La eficiencia de la separación está determinada por dos factores:

- a) La diferencia de tiempos de elución de los picos, cuanto más distantes sean, mejor será su resolución.
- b) El ancho de los picos, cuanto más anchos sean los picos menor será la resolución (Harris 2007).

Para determinar la eficiencia de separación se calcula la resolución con la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta TR}{\frac{1}{2}Wm}$$

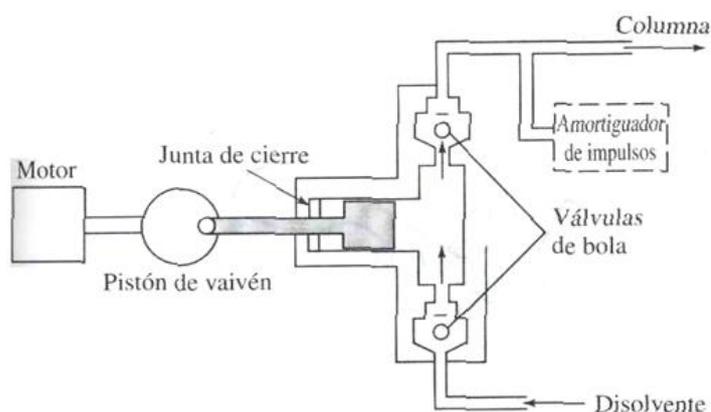
Donde  $\Delta TR$  es la variación de los tiempos de retención y  $Wm$  son los anchos de pico.

## 1.4.1 Componentes del HPLC

### 1.4.1.1 Sistema de Bombeo.

El sistema de bombeo es una parte esencial del cromatógrafo cuya función es proporcionar el flujo continuo de fase móvil a la columna cromatográfica a una presión constante (Skoog et al. 2001). Este sistema está constituido por una o más bombas, reservorios de solvente y sistema de desgasificación (Dong 2006). Las bombas deben estar construidas por materiales resistentes a la corrosión (acero inoxidable o teflón) (Skoog et al. 2001), es decir materiales compatibles con solventes orgánicos comunes, tampones y sales, que puedan ofrecer caudales típicos en un rango de 0,1-10 mL/min, flujo libre de pulsaciones, capacidad de mezclar solventes (Dong 2006).

Existen tres tipos de bombas: recíprocas, de desplazamiento y neumáticas. La bomba recíproca impulsa el solvente por el movimiento de vaivén de un pistón, que es accionado por un motor. Dos válvulas con cierre de bola que se abren y se cierran alternativamente, controlan el flujo del solvente hacia adentro y fuera del cilindro (Skoog et al. 2001). Este tipo de bombas producen un flujo pulsado que puede ocasionar ruido en la línea base del cromatograma (Skoog et al. 2001), por ello para reducir las fluctuaciones del flujo y evitar este inconveniente es necesario colocar un amortiguador de impulsos (Dong 2006). En la Figura 2 se muestra el esquema de una bomba recíproca de HPLC.



**Figura 2.** Bomba recíproca de HPLC

**Fuente:** (Skoog et al. 2001)

**Elaboración:** La autora

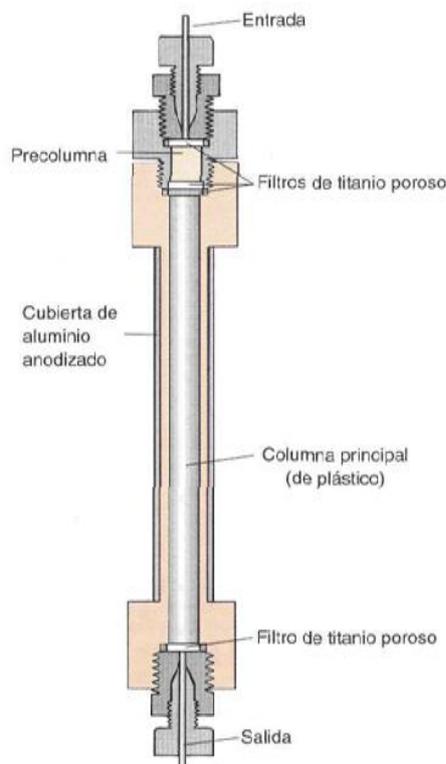
### 1.4.1.2 Sistema de Inyección.

El sistema de inyección es otro componente muy importante que se encuentra ubicado entre la bomba y la columna; el mismo que debe operar a altas presiones de hasta 7000 psi. Su funcionamiento se basa en el principio de bucle y válvula que permite la entrada de la muestra sin ingreso de aire (Skoog et al. 2001) .

### 1.4.1.3 La columna cromatográfica.

Las columnas se clasifican de acuerdo a sus dimensiones y tamaños de partícula del relleno, la más utilizada es la de 25 cm de longitud de acero inoxidable y 4,6 mm de diámetro interno, el material de empaque es sílice, con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (Skoog et al. 2001, Harris 2007).

Con la finalidad de aumentar la vida de la columna analítica se coloca delante de la columna una pre-columna, la misma que debe tener composición de relleno semejante a la columna analítica y mayor tamaño de partícula, para así minimizar la caída de presión, otra de las funciones es eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los solventes (Skoog et al. 2001). En la Figura 3 se muestran las partes de una columna cromatográfica.



**Figura 3.** Columna cromatográfica

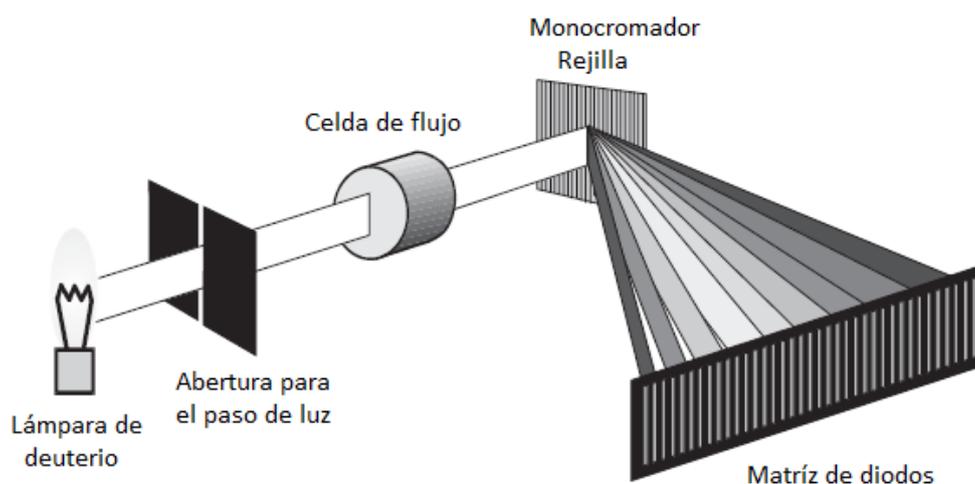
**Fuente:** (Harris 2007)

**Elaboración:** La autora

#### 1.4.1.4 Sistema de Detección.

El detector se encuentra a la salida de la columna, el mismo que debe presentar alta sensibilidad para detectar pequeñas concentraciones de analito, debe ofrecer una respuesta lineal y evitar el ensanchamiento de picos (Harris 2007). Otras de las características que debe tener un detector son: presentar una estabilidad, reproducibilidad, no ser destructivo de la muestra, no debe presentar sensibilidad a variaciones de temperatura y composición del solvente, esto con la finalidad de eliminar el ruido, el mismo que se define como “las desviaciones aleatorias observadas cuando se repiten medidas de señales que se controlan de forma continua”. Según Skoog et al (2001) existen dos tipos de ruidos que pueden afectar los análisis, estos son el químico y el instrumental, el primero puede deberse a variaciones de temperatura, humedad relativa, vibraciones, cambios de intensidad de la luz y el otro tipo de ruido llamado ruido instrumental se debe a variaciones del detector y transductor de entrada (Sierra Alonso et al. 2010). Algunas medidas que se pueden tomar para reducir el ruido son evitar la formación de burbujas en el detector aplicando una contrapresión durante la despresurización del eluyente (Harris 2007), realizar calibraciones y mantenimiento del equipo (Skoog et al. 2001).

El detector de arreglo de diodos permite registrar simultáneamente la absorbancia de la muestra en todo el rango de longitudes de onda comprendida entre 200 a 700 nm (Skoog et al. 2001). En la Figura 4 se muestran las partes del detector.



**Figura 4.** Detector de arreglo de diodos

**Fuente:** (Dong 2006)

**Elaboración:** La autora

## 1.5 Características y parámetros de calidad del método analítico

Los parámetros de calidad de un método analítico son: linealidad, precisión y exactitud. La garantía de la calidad de un método puede incluir datos que muestren una curva de calibrado lineal, los blancos con señales bajas esperadas y que los análisis replicados sean reproducibles (Harris 2007).

### 1.5.1 Linealidad

Harris (2007) define la linealidad como el intervalo de concentraciones del analito para los cuales se obtiene una respuesta proporcional a la concentración, mediante el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) se puede medir este parámetro.

Skoog et al. (2001) indica que la “linealidad comienza con la concentración más pequeña a la que se puede realizar medidas cuantitativas (límite de cuantificación) y culmina con la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad”. En la Tabla 1 se presentan las linealidades encontradas en bibliografía, para los analitos que se evalúan en la presente investigación.

Para comprobar que no existe tendencia alguna en los resultados obtenidos, se calculan los residuos, estos definidos por Gutiérrez Pullido y Vara Salazar (2008) como “la diferencia entre la respuesta observada y la respuesta predicha por el modelo en cada prueba experimental”, estos residuales permiten verificar que los errores siguen una distribución normal (Montgomery y Runger 2007).

**Tabla 1.** Rangos lineales de los compuestos fenólicos

Compuesto	Linealidad ( $\mu\text{g/mL}$ )	Coefficiente de Correlación ( $r^2$ )	Autor
Ácido gálico	2,65 - 21,00	0,9994	(Samee y Vorarat 2007)
Mangiferina y Epicatequina	5,00 - 25,00	0,9997	(Nuñez Sellés et al. 2002)
Quercetina	10,05 - 80,40	0,9999	(Samee y Vorarat 2007)

Elaboración: La autora

### 1.5.2 Precisión

Se define como la reproducibilidad de los resultados, es decir la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas replicadas o medidas que se han realizado exactamente de la misma forma (Skoog et al. 2001). El parámetro que se utilizan para medir la precisión es el coeficiente de variación (Skoog et al. 2001), dicho estadístico

proporciona una medición normalizada de la dispersión y se lo obtiene del cociente de la desviación estándar entre la media, se lo multiplica por 100 para expresarlo como porcentaje (Chapra y Canale 2007), otro parámetro que permite verificar que los coeficientes de variación se encuentran en el rango de concentración adecuado es el coeficiente de variación de Horwitz, este valor se puede obtener utilizando la trompeta de Horwitz donde se observa el nivel de concentración del analito expresado en valores adimensionales de masa, permitiendo obtener el valor en función a la magnitud de concentración que se está analizando (Rivera Orozco et al. 2010).

La falta de precisión instrumental puede provocar variaciones en la cantidad inyectada y en variaciones de la respuesta del instrumento, la precisión entre ensayos se puede evaluar analizando alícuotas de un material homogéneo varias veces por una misma persona, el mismo día y con el mismo equipo, cada análisis es independiente de tal manera que la precisión entre ensayos indica la reproducibilidad del método analítico (Harris 2007).

### **1.5.3 Exactitud**

Sierra et al. (2010) define a la exactitud como la capacidad de un método para rendir resultados próximos al valor real o teórico. En un método analítico la exactitud se puede demostrar: analizando uno o varios materiales estándar de referencia, donde las concentraciones del analito se conozcan (Skoog et al. 2001), es decir analizar un material estándar de referencia con una matriz semejante a la muestra desconocida; otra forma de demostrar la exactitud es comparando los resultados de métodos analíticos diferentes y analizar una muestra de blanco dopado con una cantidad conocida de analito o hacer adiciones de estándar de analito a la muestra (Harris 2007), que es el método que se aplicó en esta investigación.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Determinar la concentración de los principales componentes con capacidad antioxidante presentes en los subproductos de mango.

### **2.2 Objetivo específico**

Cuantificar ácido gálico, mangiferina, epicatequina y quercetina en extractos obtenidos a partir de subproductos agroindustriales de mango.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

La metodología se la ha dividido en dos partes, implementación del método cromatográfico y cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos de subproductos de mango, el diagrama del procedimiento se presenta en el Anexo 1.

### **3.1 Implementación del método cromatográfico**

Se implementó el método descrito por Nantitanon et al. (2010), para cuantificar ácido gálico, mangiferina, epicatequina y quercetina. Se utilizó estándares de la casa comercial Sigma Aldrich, los solventes ácido acético y acetonitrilo de la casa comercial Fisher Chemical (grado HPLC) y metanol marca J. T Baker, el equipo que se utilizó fue un HPLC Waters modelo 2596, con un sistema de bombas cuaternario, detector de arreglo de diodos Waters modelo 996 y software Masslynx versión 4.1 y se utilizó una columna empacada C18 de fase reversa con diámetro 4,6 mm x 250 mm y un diámetro interno de 5 µm de la casa comercial Supelco (USA).

#### **3.1.1 Identificación de compuestos fenólicos**

La identificación se realizó mediante sus tiempos de retención y espectros UV, inyectando cada estándar (30 ppm). Una vez identificados los compuestos se preparó una solución mix con todos los estándares (30 ppm).

#### **3.1.2 Mejorar resolución**

Se inyectó el mix de estándares y se realizaron variaciones a la gradiente hasta conseguir una correcta separación de los compuestos, la gradiente se formó utilizando una mezcla de solventes con ácido acético – agua en proporción (2:98, v/v) como fase A y la mezcla (0,5:95,5 v/v) ácido acético – agua con acetonitrilo en proporción (50:50, v/v) como fase B. Las variaciones consistieron en hacer mezclas de las fases móviles menos polares a la propuesta por Nantitanon et al. (2010), la gradiente que ofreció la mejor resolución se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Gradiente del método

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	95	5
15	90	10
20	60	40
55	45	55
65	20	80

**Elaboración:** La autora

En el Anexo 2 se presentan todas las condiciones del método cromatográfico.

### **3.1.3 Linealidad**

Para determinar la linealidad se partió de los rangos lineales descritos en bibliografía (véase Tabla 1). Para mangiferina, epicatequina y quercetina se trabajó con concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ppm para cada estándar, para ácido gálico se prepararon concentraciones de 1, 5, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm. En el Anexo 3 se describe el procedimiento de preparación de los estándares.

Se realizaron tres curvas para cada compuesto y se consideró lineal la curva de calibración que tenga un coeficiente de correlación mayor a 0,99 (Chapra y Canale 2007). Además se calcularon los residuos de las áreas para evaluar la distribución de los puntos.

### **3.1.4 Precisión**

Para evaluar la precisión se determinaron los coeficientes de variación (C.V) de las curvas de calibración realizadas para cada compuesto y se los comparó con los C.V de Horwitz (Rivera Orozco et al. 2010). También se calcularon los C.V de los tiempos de retención.

### **3.1.5 Exactitud**

Para realizar el criterio de exactitud se seleccionó mangiferina por ser el compuesto fenólico más importante en este subproducto (ver Gráfica 1). El análisis consistió en tomar una muestra para ser fortificada con estándar (3 repeticiones) y una muestra para medir la cantidad de mangiferina sin estándar. Se tomaron 2 g de muestra (tamaño de partícula  $>250 \leq 355 \mu\text{m}$ ), se le añadió 1 mg de estándar y se extrajo con

25 mL de metanol mediante maceración dinámica, utilizando un agitador kika modelo RO15 durante 30 min a 2000 rpm, luego se pasó por una centrífuga marca CLAY ADAMS® Brand DYNAC® (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) a 2800 rpm por 30 minutos. Se eliminaron partículas en suspensión de los extractos utilizando filtro Millipore Millex-GV Hidrophilic PVDF de 0,22 µm, se inyectó 1000 µL del sobrenadante purificado en el equipo HPLC. La muestra sin fortificar siguió el mismo procedimiento exceptuando la adición del estándar. El porcentaje de recuperación se lo calculó por medio de la fórmula:

$$\% R = \frac{CF - CU}{CA} \times 100\%$$

Donde:

CF = Concentración del analito medida en la muestra fortificada.

CU = Concentración de analito medida en la muestra sin fortificar.

CA = Concentración de analito adicionada (Harris 2007).

### 3.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos

Se analizaron 120 extractos de subproductos de mango (piel y pulpa adherida), los extractos se obtuvieron de la combinación de las condiciones descritas en la Tabla 3 para el método de extracción sólido- líquido por maceración dinámica y en la Tabla 4 para el método de extracción sólido- líquido por Soxhlet, estos extractos fueron obtenidos de la investigación: “Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de mango” desarrollada en el Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos de la UTPL.

**Tabla 3.** Condiciones de obtención de los extractos con el método de maceración dinámica

Tamaño de Partícula	Tiempo de extracción	Solvente de extracción
>500 µm		
>355 y ≤500 µm	3 h	Etanol
>250 ≤355 µm	6 h	Metanol
>125 ≤250 µm	24 h	
<125 µm.		

\*3 repeticiones por ensayo (90 extractos)

**Elaboración:** La autora

**Tabla 4.** Condiciones de obtención de los extractos por el método Soxhlet.

Tamaño de Partícula	Tiempo de extracción	Solvente de extracción
>500 $\mu\text{m}$	4 h	Etanol Metanol
>355 $\leq$ 500 $\mu\text{m}$		
>250 $\leq$ 355 $\mu\text{m}$		
>125 $\leq$ 250 $\mu\text{m}$		
<125 $\mu\text{m}$ .		

\*3 repeticiones por ensayo (30 extractos)

**Elaboración:** La autora

Para definir la concentración de extracto a inyectar, se partió pesando 10 mg/mL hasta conseguir una concentración adecuada donde se identifiquen claramente los compuestos fenólicos. Se pesó 60 mg de extracto, se disolvió con 1 mL de metanol utilizando el vórtex Labnet modelo VX100 durante 10 min a 2000 rpm, todos los extractos pasaron por el filtro Millipore Millex-GV Hidrophilic PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  previo a su inyección. El efecto de la concentración del soluto debe originar una señal tres veces mayor a la del ruido de fondo (Skoog et al. 2001), para demostrar esto se procedió a integrar los picos anteriores y posteriores a los de interés. Además se realizó la lectura de uno de los extractos por triplicado para determinar la repetibilidad.

Para expresar los resultados de las concentraciones obtenidas en mg/kg de los extractos se realizó la sumatoria de los valores obtenidos con etanol y metanol.

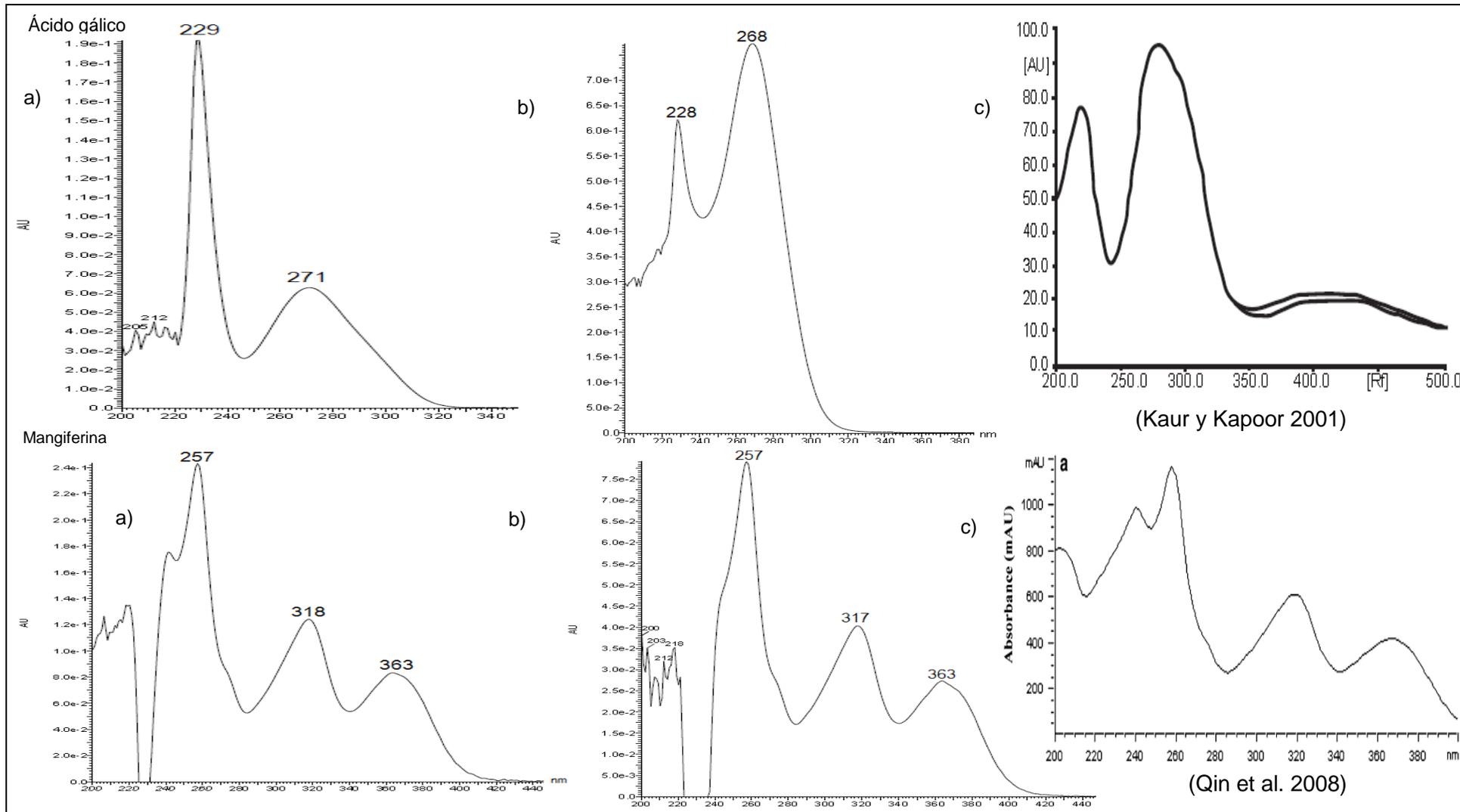
El análisis estadístico que se aplicó fue un análisis de varianza a las concentraciones obtenidas de los extractos, con la finalidad de determinar el efecto que tiene el método de extracción en sus diferentes tamaños de partícula, tiempos y solventes de extracción, para ello se utilizó el programa estadístico Minitab 16.

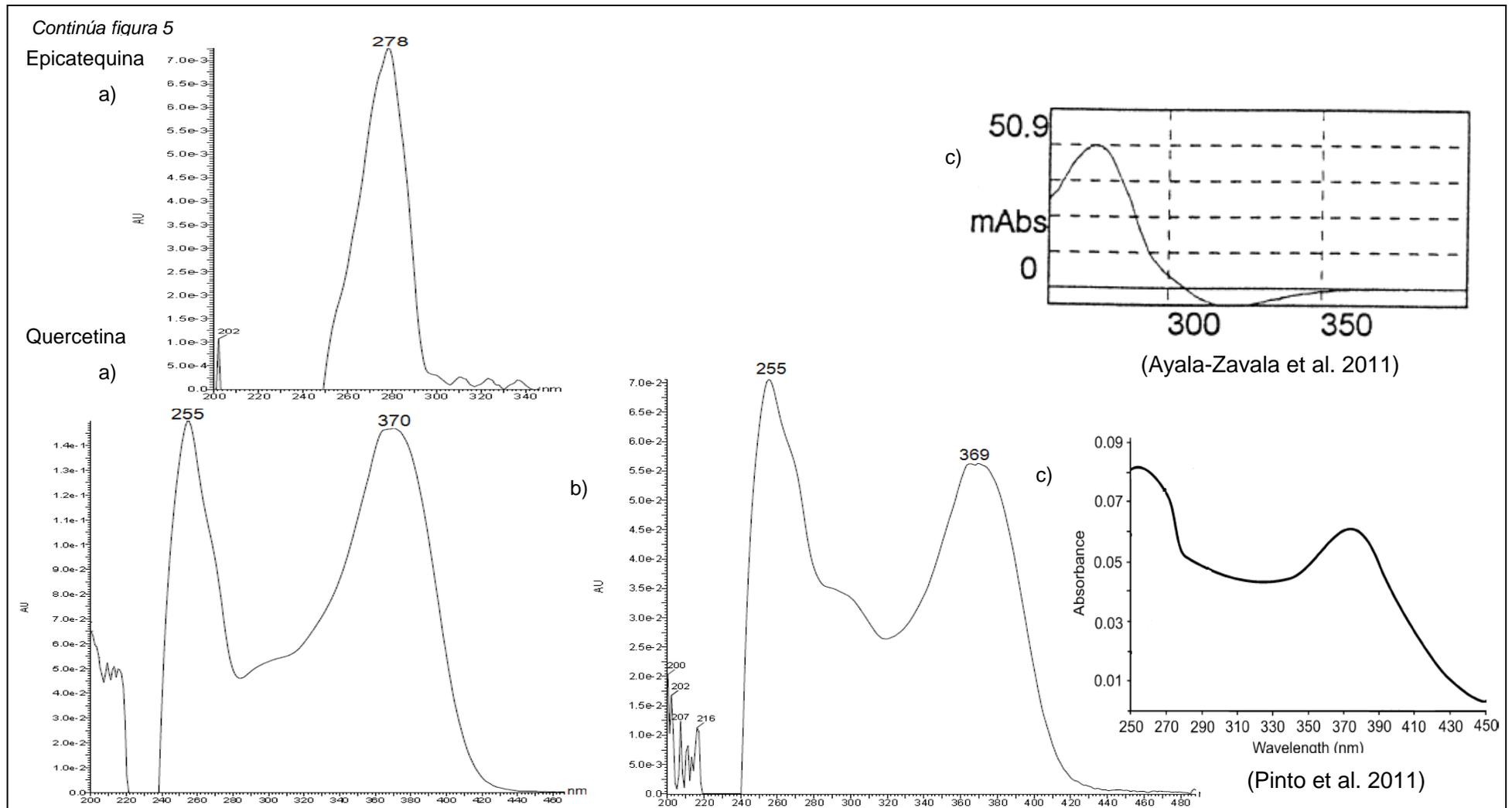
#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4.1 Implementación del método cromatográfico**

### **4.1.1 Identificación de compuestos fenólicos**

La inyección individual de los compuestos utilizando la gradiente propuesta por Nantitanon et al. (2010), permitió la elución de ácido gálico a 5,45 min, mangiferina a 28,62 min, epicatequina a 29,12 min y quercetina a 53,77 min. El espectro UV del estándar y extracto de ácido gálico presentan dos picos característicos en las longitudes de onda 228 nm y 268 nm aproximadamente, similar al espectro encontrado por Kaur y Kapoor (2001) con picos en 228 nm y 270 nm. En los espectros UV del estándar y extracto de mangiferina resaltan tres picos a 257 nm, 317 nm y 363 nm, resultados similares al espectro reportado por Qin et al. (2008) que presenta picos a 260 nm, 320 nm y 370 nm. Para epicatequina el espectro UV presenta un sólo pico definido a 278 nm, siendo muy parecido al espectro UV bibliográfico reportado por Ayala-Zavala et al. (2011) en la longitud de onda 275 nm, en el extracto no se evidenció este compuesto fenólico, finalmente el espectro UV del estándar de quercetina resalta dos picos en las siguientes longitudes de onda 255 nm y 370 nm, muy cercanas a las longitudes de onda que presenta el espectro UV de Pinto et al. (2011), al analizar el extracto se evidenciaron los picos característicos de quercetina que confirman la presencia de este compuesto en los subproductos. En la Figura 5 se presentan estos resultados.

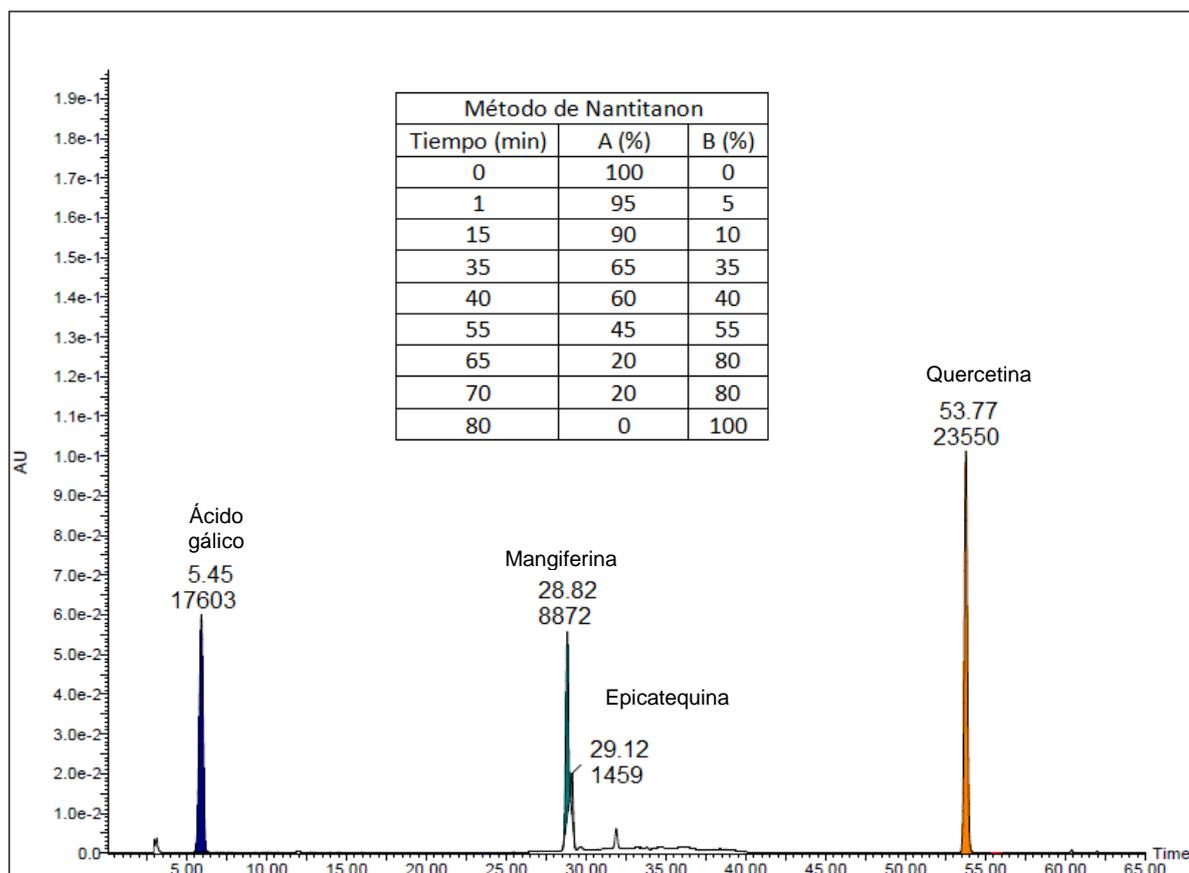




**Figura 5.** Espectro UV de los compuestos fenólicos. a) Espectro UV estándares, (b) Espectro UV extractos (c) Espectro UV bibliografía.  
**Elaboración:** La autora

#### 4.1.2 Mejorar resolución

Al inyectar la solución mix de los estándares utilizando la gradiente de Nantitanon et al. (2010) no permitió la separación de mangiferina y epicatequina (Ver Figura 6), para lo cual se realizaron cuatro modificaciones después del minuto 15.



**Figura 6.** Elución de compuestos fenólicos con la gradiente de Nantitanon.

**Elaboración:** La autora

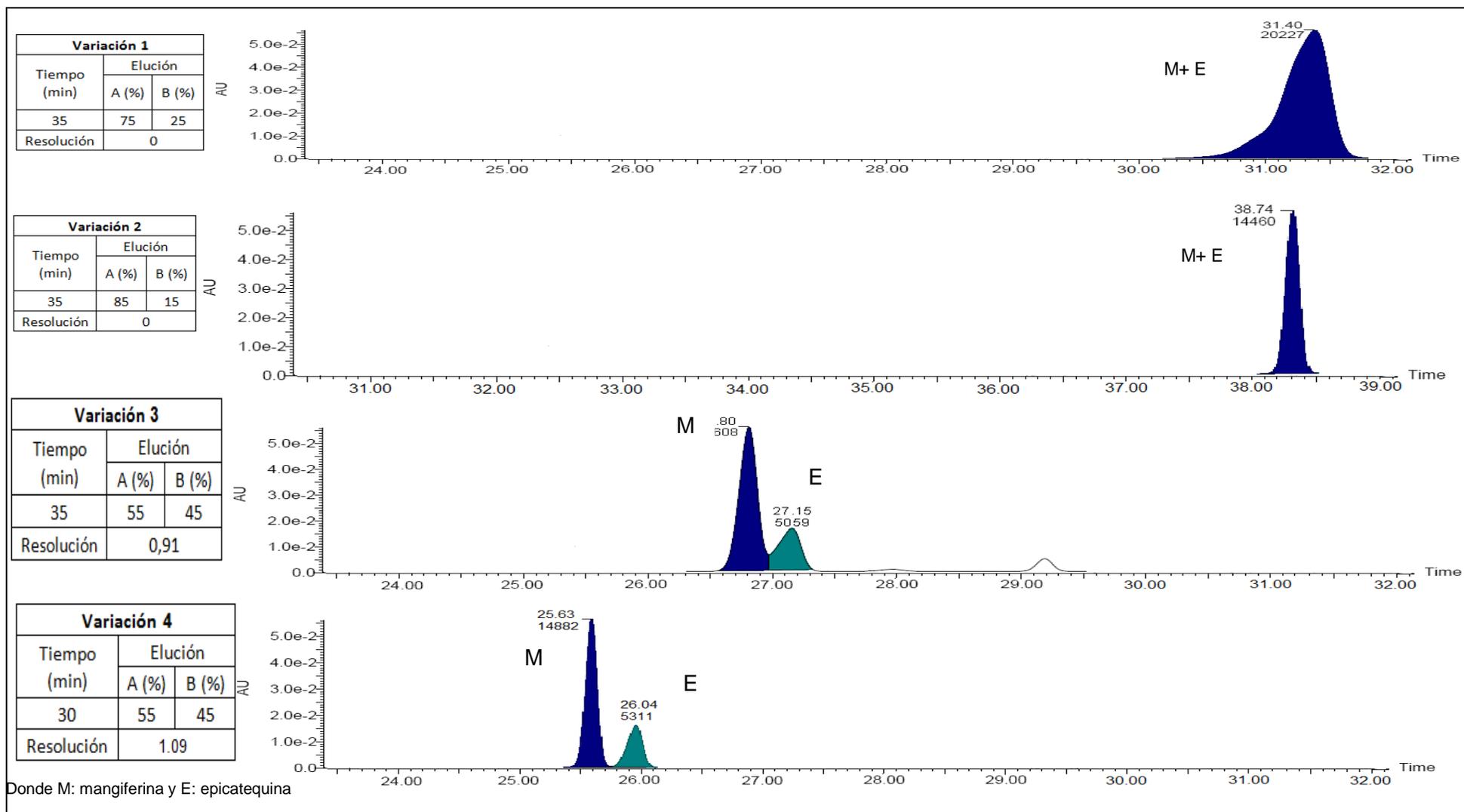
En la Tabla 5 se pueden observar todas las variaciones ensayadas que se realizaron a la gradiente y en la Figura 7 los cromatogramas con su respectiva variación y resolución.

**Tabla 5.** Variaciones en la gradiente

<b>Método de Nantitanon</b>			<b>Variación 1</b>			<b>Variación 2</b>			<b>Variación 3</b>			<b>Variación 4</b>		
Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0
1	95	5	1	95	5	1	95	5	1	95	5	1	95	5
15	90	10	15	90	10	15	90	10	15	90	10	15	90	10
35	65	35	35	75	25	35	85	15	35	55	45	30	55	45
40	60	40	40	60	40	40	60	40	40	60	40	40	60	40
55	45	55	55	45	55	55	45	55	55	45	55	55	45	55
65	20	80	65	20	80	65	20	80	65	20	80	65	20	80
70	20	80	70	0	100									
80	0	100												

**Elaboración:** La autora

Donde A (%) es el porcentaje de flujo de la fase A y B (%) porcentaje de flujo de la fase B.



**Figura 7.** Cromatogramas de las variaciones de elución.

En las dos primeras variaciones se formó una mezcla de fases móviles más polar, donde las variaciones consistieron en modificar en el minuto 35 la proporción: 75% de fase A y 25% de fase B (variación 1) y 85% de fase A y 15% de fase B (variación 2), con estas variaciones mangiferina y epicatequina no se separaron, debido a que si aumenta la polaridad de la mezcla de solventes, los compuestos tardan en eluir impidiendo su separación, así la primera variación coeluye a 31,40 min y la segunda a 38,74 min. Al notar que la gradiente propuesta por Nantitanon et. al (2010) en el minuto 35 tenía una polaridad menor en la mezcla de solventes (65% - 35% fase A y B) a las inyectadas anteriormente, en la variación 3 se formó una mezcla de solventes con una proporción de menor polaridad (55% - 45% fase A y B) a la propuesta por Nantitanon et al. (2010), logrando una mejor separación de mangiferina y epicatequina, con una resolución de 0,91, el tiempo de retención se reduce conforme se realizan los cambios en la proporción de solventes, en esta variación mangiferina eluyó al minuto 26,80 min y epicatequina a 27,15 min. La última variación consistió en cambiar en el minuto 30 la gradiente en proporción 55% y 45% de fase A y B respectivamente, eluyendo mangiferina a 25,63 min y epicatequina a 26,04 min, permitiendo la separación de estos compuestos y presentando una resolución de 1,09.

#### **4.1.3 Linealidad**

Se encontró respuesta lineal para ácido gálico de 1 a 200 ppm y para mangiferina, epicatequina y quercetina de 1 a 30 ppm. A partir de las áreas registradas para cada concentración se calcularon los coeficientes de correlación, resultando éstos mayores a 0,99, lo que indica una buena linealidad, pero las áreas son repetibles para concentraciones comprendidas entre 5 a 200 ppm para ácido gálico, de 5 a 30 ppm para mangiferina, de 5 a 25 ppm para epicatequina y de 5 a 20 ppm para quercetina. En la Tabla 6 se presentan las ecuaciones de las curvas de calibración para las tres repeticiones de linealidad, utilizando la variación 4 y los rangos que los compuestos presentaron repetibilidad, en la Figura 8 se presentan las curvas de calibración de cada compuesto en sus rangos repetibles y en el Anexo 4 se encuentran los datos de las linealidades correspondientes a cada compuesto.

**Tabla 6.** Calibración de las curvas de los compuestos fenólicos

<b>Compuesto</b>	<b>Ecuación</b>	<b>Coefficiente de Correlación (r<sup>2</sup>)</b>
Ácido gálico	$y = (939,16 \pm 79,92)x + (2638,31 \pm 1996,02)$	$0,997 \pm 0,004$
Mangiferina	$y = (592,84 \pm 75,39)x + (-714,69 \pm 466,74)$	$0,996 \pm 0,005$
Epicatequina	$y = (180,85 \pm 32,51)x + (-142,07 \pm 78,25)$	$0,995 \pm 0,004$
Quercetina	$y = (913,39 \pm 168,63)x + (-1066,67 \pm 148,33)$	$0,997 \pm 0,002$

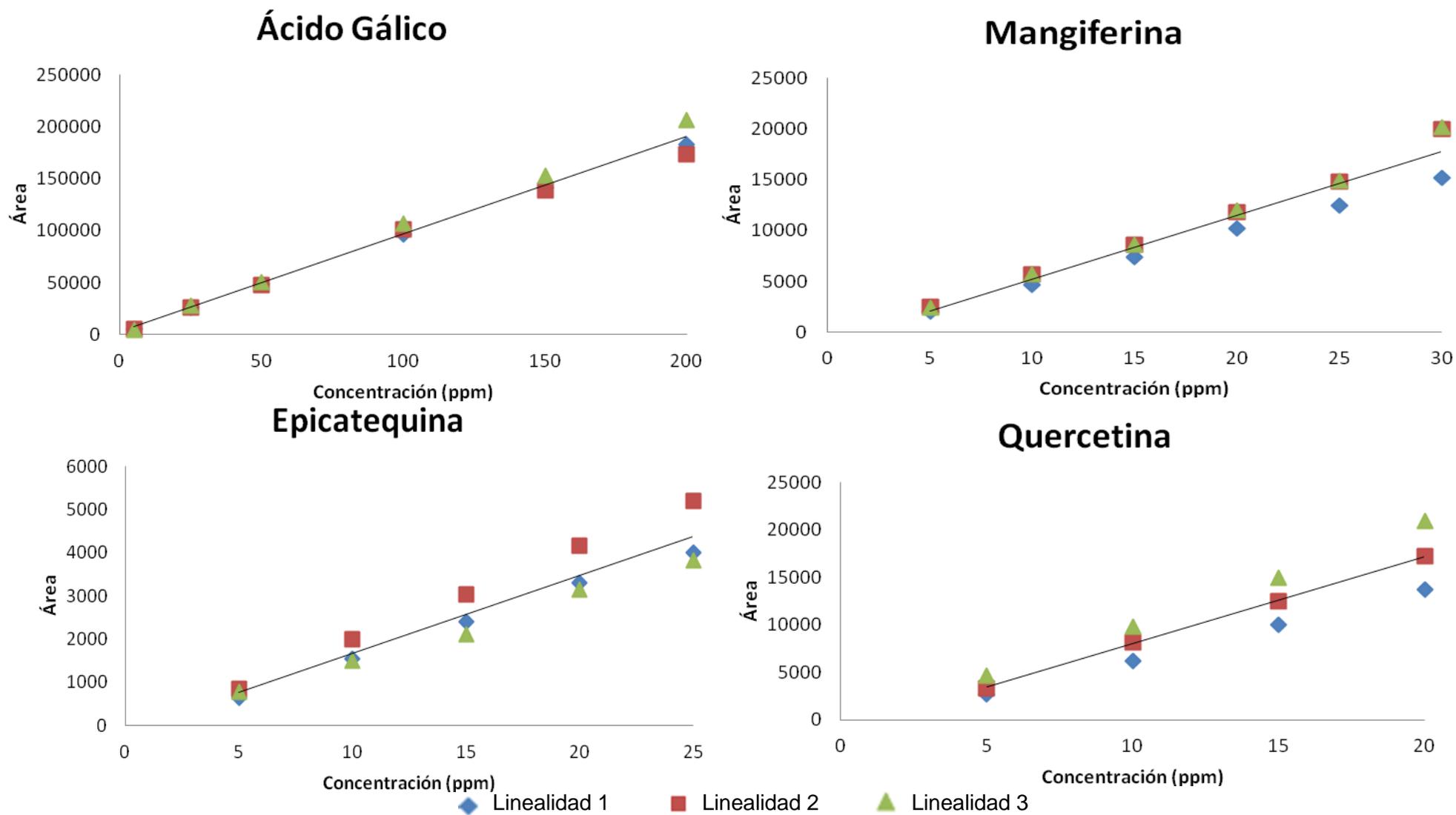


Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico, mangiferina, epicatequina y quercetina.

Para comprobar que los datos son linealmente aceptables se siguió la referencia bibliográfica de Draper y Smith citado por Chapra y Canale (2007) en la cual indican que: para la regresión por mínimos cuadrados debe tener una dispersión de los puntos similar a la del rango de datos y la distribución de los puntos cerca de la línea es normal, para esto se calcularon los residuos (tres repeticiones de linealidad), en la Figura 9 se observa que los residuos presentan una dispersión y no son diferentes entre sí en función a la concentración y en cada linealidad realizada se pueden observar puntos sobre y bajo la línea, de igual forma en el Anexo 4 se presentan los valores de los residuos con valores positivos y negativos lo que indica que se trata de una distribución normal, sin evidenciar tendencia alguna, cumpliendo con la referencia mencionada.

El rango de linealidad en algunos casos se ha ampliado o reducido; por ejemplo para ácido gálico se encontró una concentración menor a 2,65 ppm como límite inferior y una concentración mayor a 21 ppm como límite superior, siendo estos los rangos lineales que propone Samee y Vorarat (2007) para este compuesto. Para mangiferina y epicatequina se encontró una concentración menor a 5 ppm como límite inferior y una concentración mayor a 25 ppm como límite superior que son los rangos que reporta Nuñez Sellés et al. (2002), finalmente para quercetina se ha encontrado una concentración menor a 10,05 ppm como límite inferior y se ha reducido el límite superior de 80,40 ppm reportados por Samee y Vorarat (2007) a 30 ppm. (Ver Tabla 1). Con esto se consiguió tener un rango de concentraciones que puedan comprender las áreas que presentan los extractos.

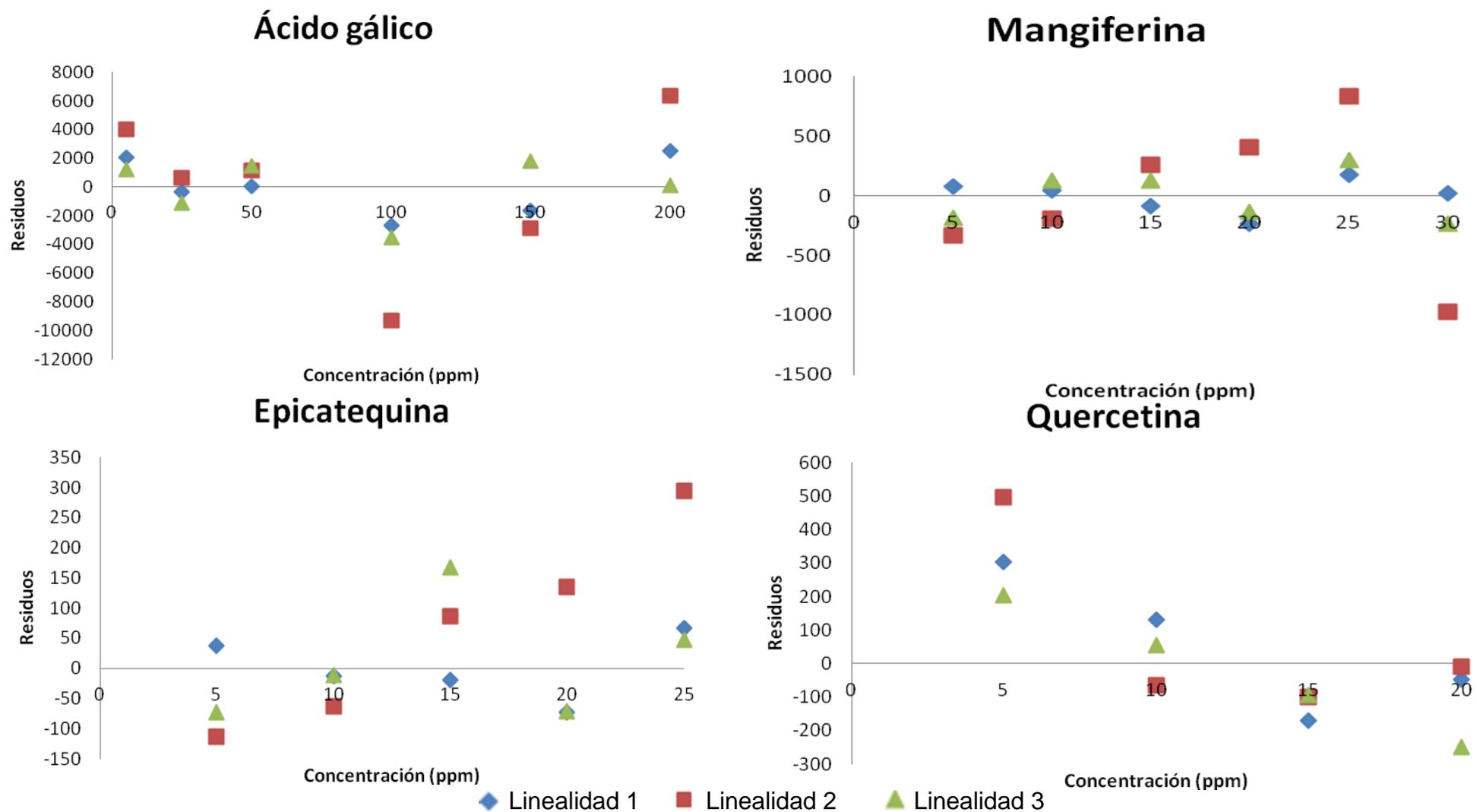


Figura 9. Residuos de las linealidades para cada compuesto fenólicos.

Al finalizar las pruebas de linealidad se evidenció un problema de saturación en la columna cromatográfica ocasionando nuevamente la coelución de mangiferina y epicatequina, siendo necesario realizar una nueva variación en la gradiente, dicha variación consistió en eliminar el minuto 30 y 40 de la variación 5 y añadir el minuto 20 con una mezcla de solventes de 60% de fase A y 20% de fase B, el resto de la gradiente continuó igual que la variación 5, en la Figura 10 se observan los cromatogramas con los cuatro compuestos fenólicos utilizando la variación 4 y variación 5 con su respectiva resolución y gradiente. La resolución en esta variación es de 1.73 cumpliendo con el criterio de Harris (2007), donde indica que los análisis cuantitativos deben presentar una resolución  $>1.5$  (Ver cálculos de resolución en el Anexo 5). Al modificar la gradiente los tiempos de retención también cambiaron, así el ácido gálico ( $T_R= 5.66$  min), mangiferina ( $T_R= 22.50$  min), epicatequina ( $T_R= 22.88$  min) y quercetina ( $T_R= 38.80$  min), estos presentaron una buena simetría y coeficientes de correlación de 0.99 (Ver Anexo 6). Las condiciones cromatográficas que permitieron el desarrollo del método fueron la gradiente realizada con la variación 5.

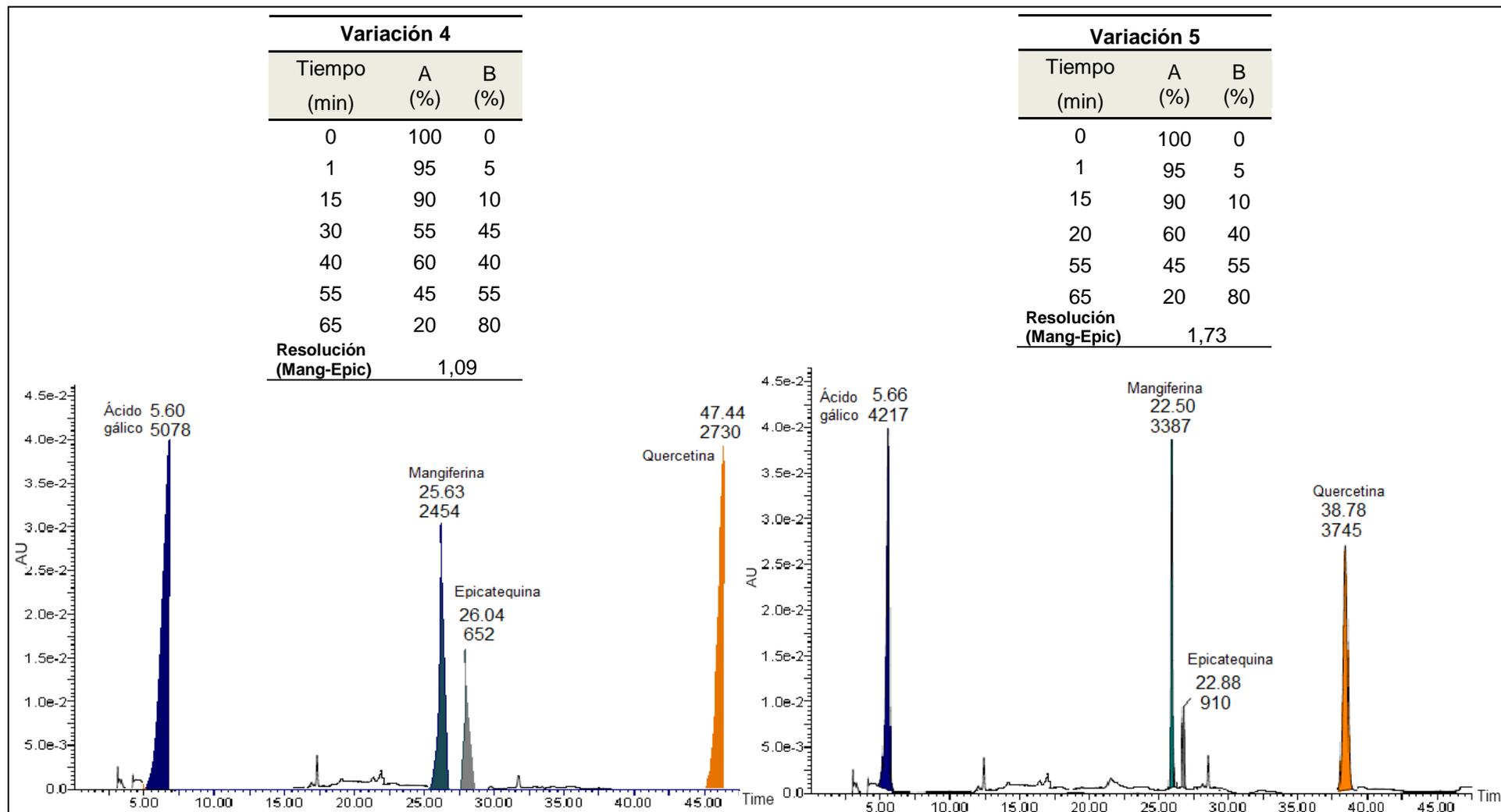


Figura 10. Cromatograma de los compuestos fenólicos en su orden de elución.

#### 4.1.4 Precisión

Las concentraciones planteadas para ácido gálico (repetibles en 5, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm), mangiferina (repetibles en 5,10, 15, 20, 25 y 30 ppm), epicatequina (repetibles en 5, 10, 15, 20 y 25 ppm) y quercetina (repetible 5, 10, 15 y 20 ppm), los C.V de Horwitz correspondientes a las concentraciones planteadas para los compuestos en estudio se encuentran entre 8 a 16% (Rivera Orozco et al. 2010), las áreas que presentan repetibilidad para ácido gálico tienen un C.V entre 5,59 a 5,69% (ver Anexo 4), para mangiferina se presentan C.V entre 7,42 a 14,75%, para epicatequina se tienen C.V entre 13,85% a 17,18% y para quercetina los C.V se encuentran entre 19,86% a 28,58%, los C.V elevados de estos dos últimos compuestos pudieron deberse a la presencia de ruido químico o instrumental como variaciones de temperatura en el laboratorio, humedad relativa, vibraciones, entre otras (Skoog et al. 2001). Uno de los parámetros que no se pudo controlar fueron las fluctuaciones de temperatura debido a que el horno con el que se trabajó no permite mantener una temperatura estable y la habitación donde se encuentra el HPLC tuvo variaciones de temperatura debido al mal funcionamiento del aire acondicionado.

Se determinaron también los C.V de los tiempos de retención para cada compuesto, los mismos que están comprendidos entre 0,10 a 2,39% (ver Anexo 4), Rodríguez Osuna et al. (2000) indican que un C.V del 10% atribuye una buena estimación.

Finalmente para cumplir con el criterio de precisión en los extractos, se escogió un extracto al azar y se lo inyectó por tres veces, los coeficientes de variación de las áreas de los compuestos fenólicos se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Coeficientes de variación de las áreas de los compuestos fenólicos

Repeticiones	Ácido Gálico	Mangiferina	Quercetina
1	78654	1650	3401
2	82081	1585	3231
3	78755	1558	3461
% C.V	2,44	2,96	3,55

En este caso también se cumple con el criterio de Rodríguez Osuna et al. (2000) sobre los coeficientes de variación.

#### 4.1.5 Exactitud

El porcentaje de recuperación de la mangiferina en las tres repeticiones fue de  $52,97 \pm 5,74\%$  y un coeficiente de variación de 10,83%, en el Anexo 7 se pueden observar los

cálculos de la recuperación. Otras investigaciones han obtenido un porcentaje de recuperación de 85.15% de mangiferina en mango proveniente de China (Fenglei et al. 2012).

## **4.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos**

### **4.2.1 Definir la concentración de extractos**

Se inyectó un extracto en concentración de 10 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL y 80 mg/mL, los picos de las dos primeras concentraciones no se encontraron bien definidos, la concentración de 80 mg/mL hizo que se sature la columna y la concentración de 60 mg/mL permitió una clara identificación de los compuestos. En la Figura 11 se presentan los cromatogramas de ácido gálico, mangiferina y quercetina con las concentraciones experimentadas. En todos los extractos analizados de subproductos de mango no existió la presencia de epicatequina, por ejemplo el estudio de Nuñez Sellés et al. (2002) encontró epicatequina en la corteza del tallo del mango.

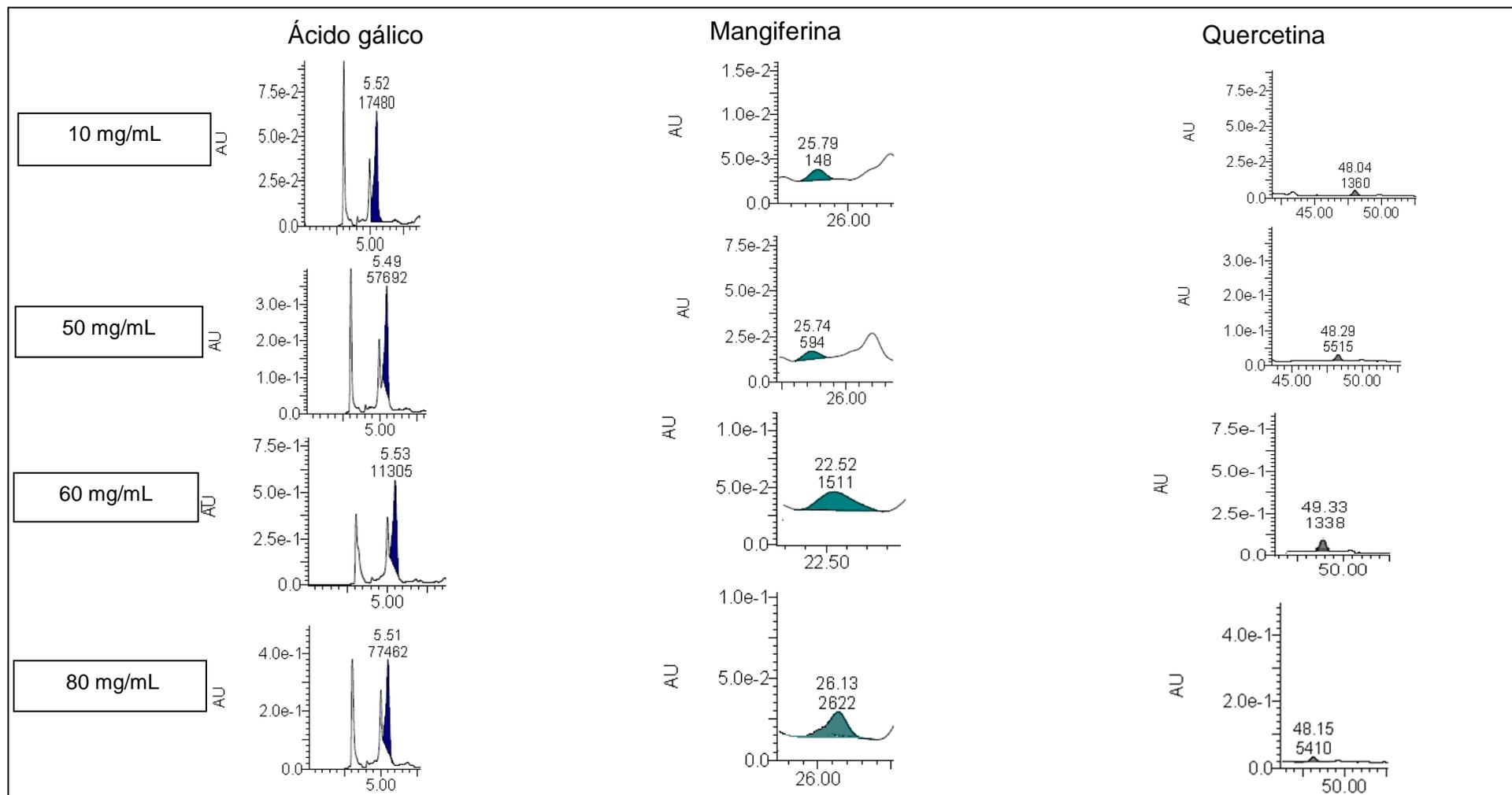


Figura 11. Cromatogramas de ácido gálico, mangiferina y quercetina con las concentraciones de extracto experimentadas.

En el Anexo 8 se presentan los cálculos respectivos de la señal – ruido, obteniéndose valores que cumplen con el criterio de Skoog et al. (2001), únicamente mangiferina no cumple con este criterio en el pico posterior, esto fue debido a que este pico corresponde a epicatequina.

#### **4.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos**

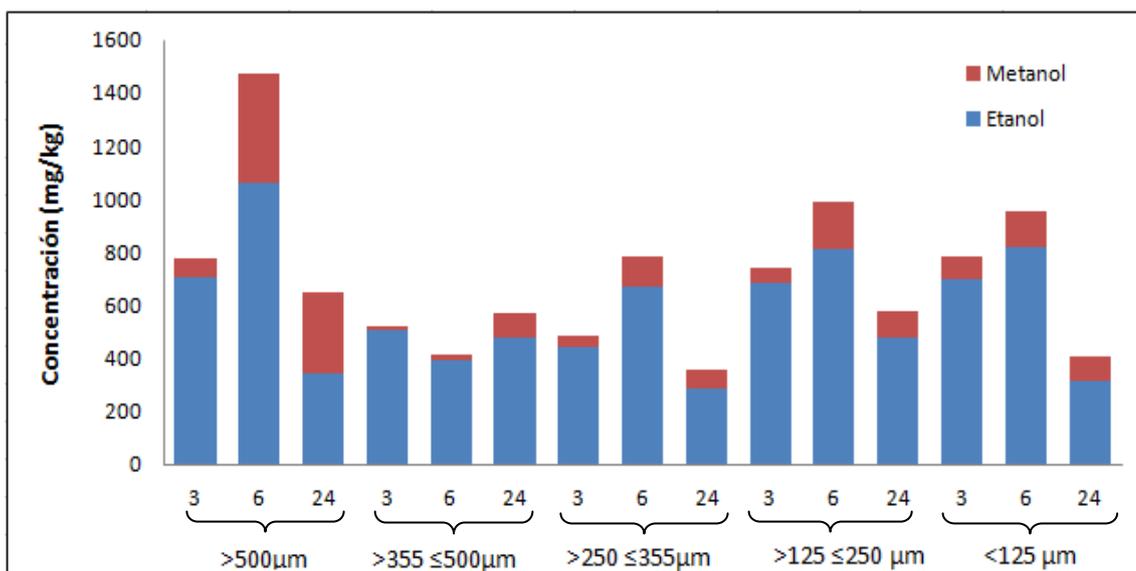
A continuación se presentan las concentraciones de ácido gálico, mangiferina y quercetina en los extractos de los subproductos de mango, expresados como la sumatoria de la concentración obtenida con etanol y metanol. Se utilizó el método de Soxhlet como un patrón de comparación. En el Anexo 9 se presenta la nomenclatura de los resultados obtenidos y la codificación de los extractos de acuerdo a su tamaño de partícula.

##### **4.2.2.1 Ácido gálico**

En la Gráfica 2 se observan los resultados de la concentración de ácido gálico con el método de maceración dinámica, expresados como sumatoria (etanol y metanol), presentándose el mayor contenido con una concentración de 1471 mg/kg ms, obtenido con el tamaño de partícula >500  $\mu\text{m}$  y un tiempo de extracción de 6 horas. El Anexo 10 presenta los resultados obtenidos para ácido gálico con ambos métodos (maceración dinámica y Soxhlet) y los cálculos se muestran el Anexo 11.

En el estudio que presenta Soong y Barlow (2006) cuantificó ácido gálico en extractos obtenidos con etanol de la semilla de mango, encontrando una concentración de 202,7 mg/kg ms, el resultado obtenido en la presente investigación es superior al mencionado.

Para el subproducto en estudio (piel) no se encontraron datos pero con la investigación realizada se puede confirmar la presencia de ácido gálico en este subproducto. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existe diferencia significativa en el tamaño de partícula y tiempo de extracción con respecto a la concentración de ácido gálico obtenida con maceración dinámica, expresada como sumatoria (etanol y metanol), ver Anexo 12.



**Gráfica 2.** Cuantificación del ácido gálico con el método de maceración dinámica.

El mayor contenido de ácido gálico expresado como sumatoria con el método Soxhlet fue de 1092 mg/kg ms, obtenido con el tamaño de partícula >500 µm y 4 horas de extracción. La Tabla 8 presenta los datos de la extracción con etanol y la sumatoria a los diferentes tamaños de partícula.

**Tabla 8.** Contenido de ácido gálico con el método Soxhlet.

Tamaño de Partícula (µm)	Ácido gálico	
	Etanol (mg/kg)	Sumatoria (mg/kg)
> 500	943 ± 247,67 <sup>a</sup>	1092 ± 134,20 <sup>a</sup>
>355 ≤500	612 ± 151,55 <sup>a</sup>	686 ± 86,62 <sup>a</sup>
> 250 ≤ 355	121 ± 11,18 <sup>b</sup>	140 ± 6,92 <sup>b</sup>
> 125 ≤ 250	568 ± 98,68 <sup>b</sup>	629 ± 54,81 <sup>b</sup>
< 125	352 ± 20,53 <sup>a</sup>	398 ± 17,86 <sup>a</sup>

\*Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas experimentales.

\*Las medias que no comparten una letra en una misma columna son significativamente diferentes.

En el estudio de Barreto et al. (2008) sobre la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos de la piel, semillas y hojas de mango (*Mangifera indica* L.) en diferentes variedades presenta 20 mg/kg ms de contenido de ácido gálico en la piel de mango, utilizando el método Soxhlet, el resultado obtenido en el presente estudio es superior al compararlo con el estudio de Barreto et al. (2008).

Al realizar el análisis estadístico se encontró diferencia significativa en la interacción tamaño de partícula y tiempo con respecto a la concentración de ácido gálico obtenida con el método de Soxhlet, expresada como la sumatoria, ver Anexo 12.

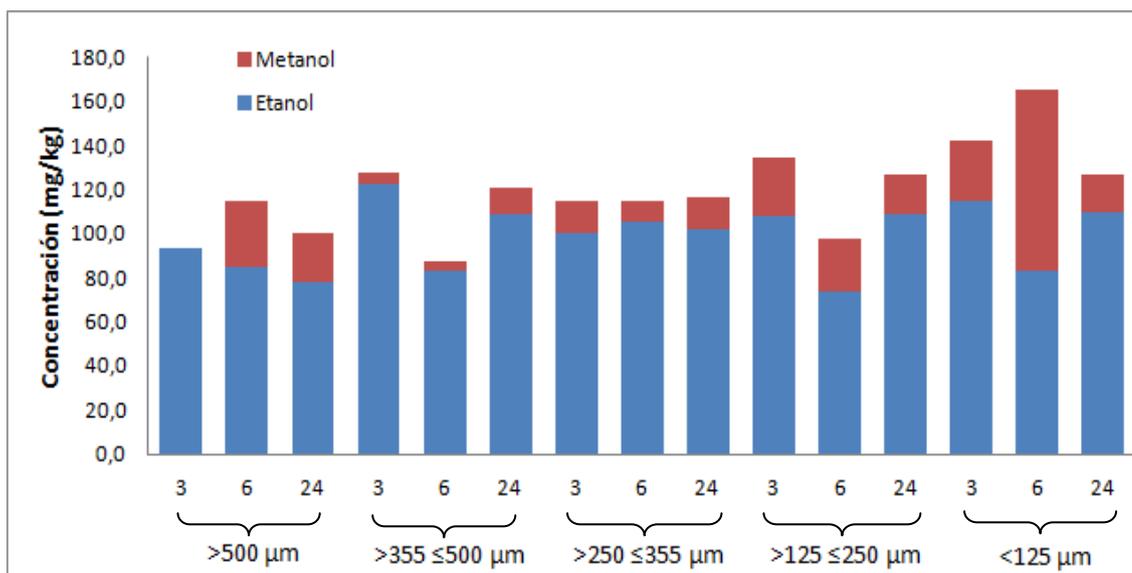
Al comparar estadísticamente los mejores resultados de ambos métodos (maceración dinámica y Soxhlet) expresados como la sumatoria entre los dos solventes, se comprobó que existe diferencia significativa, en este caso la mayor concentración de ácido gálico se presenta con el método de maceración dinámica, ver Anexo 13.

#### **4.2.2.2 Mangiferina**

El mayor contenido de mangiferina expresado como sumatoria entre etanol y metanol, obtenido con el método de maceración dinámica fue de 166 mg/kg ms, con el tamaño de partícula <125 µm y 6 horas de extracción. En la Gráfica 3 se encuentran los datos obtenidos para este compuesto fenólico, el Anexo 14 presenta los datos de los compuestos que contienen mangiferina con ambos métodos y el Anexo 11 presenta como fueron obtenidos los valores.

En el estudio que presenta Ribeiro et al. (2008) sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en las variedades de mango brasileño (*Mangifera indica* L.), donde los extractos fueron obtenidos utilizando metanol - agua en relación 60:40 v/v, encontró una mayor concentración de mangiferina en la piel de mango en la variedad Ubá, presentando esta una concentración de 199 mg/kg ms, los resultados que presenta Ribeiro et al.(2008) son superiores a los obtenidos en esta investigación, esto puede ser debido a la variedad de mango que se utilizó y también al solvente de extracción, sabiendo que las soluciones acuosas permiten una mejor extracción.

Al realizar el análisis estadístico se encuentra diferencia significativa en el tamaño de partícula y tiempo de extracción con respecto a la concentración de mangiferina obtenida con el método de maceración dinámica, expresados como sumatoria de los dos solventes, ver Anexo 15.



**Gráfica 3.** Cuantificación de mangiferina con el método de maceración dinámica.

Con el método de Soxhlet el mayor contenido de mangiferina expresado como sumatoria (etanol y metanol) fue de 137 mg/kg ms, obtenido con el tamaño de partícula >500 µm y 4 horas de extracción. En la Tabla 9 se observan los datos obtenidos de mangiferina.

**Tabla 9.** Contenido de mangiferina con el método Soxhlet.

Tamaño de Partícula (µm)	Mangiferina	
	Etanol (mg/kg)	Sumatoria (mg/kg)
> 500	128 ± 19,66 <sup>a</sup>	137 ± 10,51 <sup>a</sup>
>355 ≤500	11 ± 2,71 <sup>c</sup>	14 ± 2,02 <sup>c</sup>
> 250 ≤ 355	14 ± 5,76 <sup>bc</sup>	18 ± 3,19 <sup>c</sup>
> 125 ≤ 250	46 ± 5,98 <sup>bc</sup>	51 ± 3,76 <sup>b</sup>
< 125	40 ± 8,09 <sup>bc</sup>	42 ± 4,64 <sup>bc</sup>

\*Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas experimentales.

\*Las medias que no comparten una letra en una misma columna son significativamente diferentes

En la investigación de Ribeiro et al.(2008) presenta un mayor contenido de mangiferina (199 mg/kg ms), pero como se explicó anteriormente pudo deberse a la variedad de mango con la que se trabajó.

Al realizar el análisis estadístico se encuentra diferencia significativa en el tamaño de partícula y tiempo de extracción con respecto a la concentración de mangiferina con el método de Soxhlet, expresado como sumatoria, ver Anexo 15. Al comparar

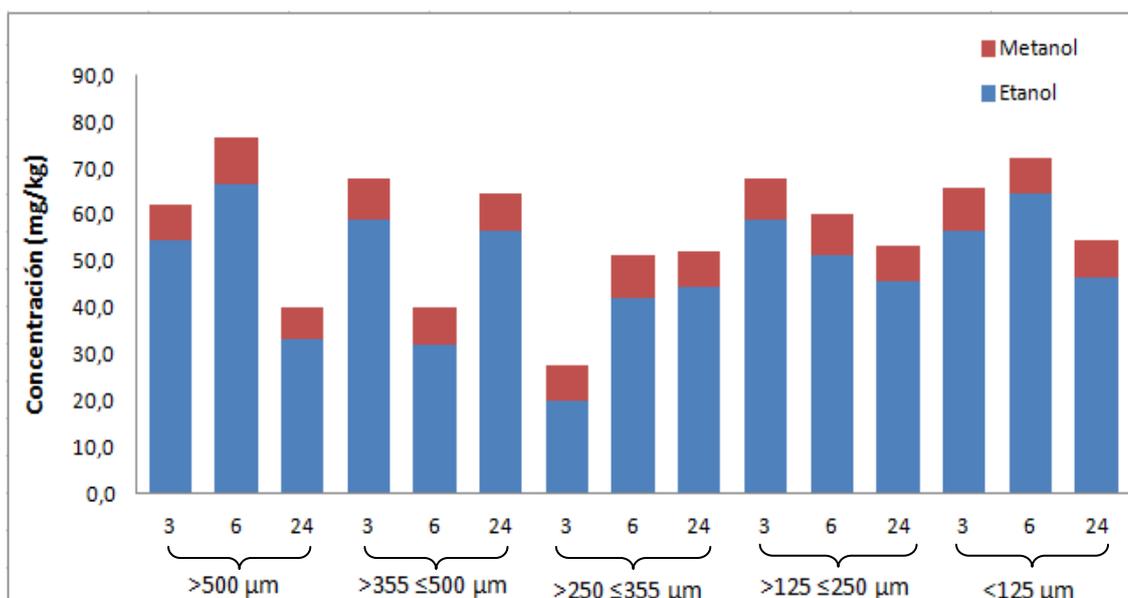
estadísticamente los mejores resultados provenientes de ambos métodos (maceración dinámica y Soxhlet), obtenidos con la sumatoria entre etanol y metanol, se encontró que no existe diferencia significativa, por ello se puede seleccionar la concentración obtenida con el método de Soxhlet, debido a que este método emplea menor tiempo (4 horas) y un tamaño de partícula de fácil obtención ( $>500\ \mu\text{m}$ ), ver Anexo 16.

#### **4.2.2.3 Quercetina**

En la Gráfica 4 se observan los resultados de la concentración de quercetina obtenidos con el método de maceración dinámica, presentándose el mayor contenido de 77 mg/kg ms, con el tamaño de partícula  $>500\ \mu\text{m}$  y 6 horas de extracción. En el Anexo 17 se encuentran los datos de los extractos que contienen quercetina con ambos métodos y en el Anexo 11 se presentan los cálculos realizados.

En el estudio de Ribeiro et al. (2008) identificó los compuestos fenólicos en la pulpa, piel y semilla, obteniendo un contenido de quercetina en la piel de mango de 64,1 mg/kg ms en la variedad Ubá, la presente investigación presenta un resultado mayor al bibliográfico.

Al realizar el análisis estadístico se encontró diferencia significativa en el tiempo de extracción y tamaño de partícula con respecto a la concentración de quercetina obtenida con el método de maceración dinámica, expresada como la sumatoria de ambos solventes, ver Anexo 18.



**Gráfica 4.** Cuantificación de quercetina con el método de maceración dinámica.

Con el método de Soxhlet el mayor contenido de quercetina expresado como sumatoria fue de 96 mg/kg ms, obtenidos con el tamaño de partícula >500 µm y 4 horas de extracción. En la Tabla 10 se pueden observar los resultados.

**Tabla 10.** Contenido de quercetina con el método Soxhlet

Tamaño de Partícula (µm)	Quercetina	
	Etanol (mg/kg)	Sumatoria (mg/kg)
> 500	86 ± 12,00 <sup>a</sup>	96 ± 6,43 <sup>a</sup>
>355 ≤500	38 ± 7,81 <sup>a</sup>	43 ± 4,92 <sup>a</sup>
> 250 ≤355	16 ± 1,66 <sup>a</sup>	20 ± 1,26 <sup>b</sup>
> 125 ≤250	33 ± 5,83 <sup>ab</sup>	39 ± 3,31 <sup>ab</sup>
< 125	40 ± 8,78 <sup>b</sup>	43 ± 5,16 <sup>b</sup>

\*Cada valor es la media con la desviación estándar de tres réplicas experimentales.

\*Las medias que no comparten una letra en una misma columna son significativamente diferentes.

La mayor concentración de quercetina en los subproductos fue la obtenida con el método de Soxhlet, al realizar la comparación con el estudio de Barreto et al. (2008) el cual utiliza el mismo método de extracción indica que el contenido de quercetina en la piel de mango es de 910 mg/kg ms, la concentración obtenida en esta investigación es muy baja porque pudieron afectar aspectos como la variedad y la madurez de las

frutas que inciden en la concentración de los compuestos fenólicos como lo demuestran en sus estudios Lee y Talcott (2004) y Guyot et al. (2003) que a mayor madurez de la fruta, existía mayor concentración de compuestos fenólicos principalmente en la piel de la fruta.

Al realizar el análisis estadístico con el método de Soxhlet se encontró diferencia significativa en el tamaño de partícula y tiempo de extracción con respecto a la concentración de quercetina expresada como sumatoria, ver Anexo 18. Al analizar los mejores resultados obtenidos por ambos métodos (maceración dinámica y Soxhlet), no se encontró diferencia significativa, resultando mejor el método Soxhlet ya que presenta mayor contenido y emplea menor tiempo de extracción, ver Anexo 19.

Los mejores resultados obtenidos en la presente investigación se obtuvieron con el tamaño de partícula  $>500 \mu\text{m}$ , al comparar con el estudio de Figueroa Hurtado et al. (2012) se encuentra que la mayor concentración de compuestos fenólicos se obtienen con el tamaño de partícula  $>500 \mu\text{m}$ .

## CONCLUSIONES

- Se pudo cuantificar ácido gálico, mangiferina y quercetina en los subproductos de mango (piel y pulpa adherida) de la variedad Tommy Atkins, la concentración de ácido gálico estuvo comprendida entre 140 y 1471 mg/kg ms, mangiferina entre 14 y 166 mg/kg ms, quercetina entre 20 y 96 mg/kg ms y no fue detectada epicatequina.
- La mayor concentración para ácido gálico fue 1471 mg/kg ms mediante maceración dinámica por 6 horas y tamaño de partícula >500  $\mu\text{m}$ , para mangiferina 166 mg/kg por maceración dinámica por 6 horas y tamaño de partícula >125  $\mu\text{m}$  y para quercetina 96 mg/kg ms por el método Soxhlet por 4 horas y tamaño de partícula >500  $\mu\text{m}$ .
- El método HPLC desarrollado permitió cuantificar en subproductos de mango (*Mangifera indica* L.) los compuestos fenólicos que demuestran una repetibilidad en los rangos de 5 a 200 ppm para ácido gálico, de 5 a 30 ppm para mangiferina, de 5 a 25 ppm para epicatequina y de 5 a 20 ppm para quercetina y presentan un linealidad con coeficientes de correlación de 0,99.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar una curva de calibración cada vez que se reinicie el equipo, debido que la repetibilidad se pierde al reiniciar el detector.
- Realizar mantenimiento del aire acondicionado del laboratorio donde se encuentra el equipo para evitar fluctuaciones en la temperatura ambiente, que puedan ocasionar variaciones en los resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ajila, CM; Aalami, M; Leelavathi, K; Prasada Rao, UJS. 2010. Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(1): 219–224.
- Ayala-Zavala, J; Rosas-Domínguez, C; Vega-Vega, V; González-Aguila, G. 2010. Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science* 75(8): 175-181.
- Ayala-Zavala, JF; Vega-Vega, V; Rosas-Domínguez, C; Palafox-Carlos, H; Villa-Rodríguez, JA; Wasim Siddiqui, M; Dávila-Aviña, JE; González-Aguilar, GA. 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* 44(7): 1866–1874.
- Balasundram, N; Sundram, K; Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1): 191–203.
- Barreto, JC; Trevisan, MTS; Hull, WE; Erben, G; Brito, ES; Pfundstein, B; Wurtele, G; Spiegelhalder, B; Owen, RW. 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.
- Cervera, P; Clapés, J; Rigolfas, R. 2004. Alimentación y dietoterapia. Cuarta Edición. Madrid, McGraw-Hill-Interamericana. 245.
- Comité Técnico Regional. 2007. Caracterización de la Agrocadena del Mango (en línea). Costa Rica Consultado 5 abr. 2013. Disponible en [www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00052.pdf](http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00052.pdf).
- Crane, JH; Campbell, CW. 1994. The Mango (en línea). Florida. University of Florida Consultado 15 ene. 2013. Disponible en [aggie-horticulture.tamu.edu/.../MangoFlorida.pdf](http://aggie-horticulture.tamu.edu/.../MangoFlorida.pdf).
- Chapra, S; Canale, R. 2007. Método numéricos para ingenieros Quinta Edición. Mexico. 471.
- Dai, J; Mumper, RJ. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15(10): 7313-7352.
- Dong, MW. 2006. Modern HPLC for Practicing Scientist. Cananda, John Wiley & Sons, Inc., Publication. 286.
- El Agro. 2013. Ecuador arranca con la cosecha del mango (en línea). 203. Guayaquil. Consultado 2 abr. 2013. Disponible en

<http://www.revistaelagro.com/2012/12/19/ecuador-arranca-con-la-cosecha-del-mango/>.

Evans, EA. 2008. Recent Trends in World and U.S. Mango Production, Trade, and Consumption (en línea). Florida. Consultado 16 mar. 2013. Disponible en <http://windows2.net/r/recent-trends-in-world-and-us-mango-production-trade-and-w966.html>.

Fenglei, L; Qiang, L; Yuqin, Z; Guibing, H; Guodi, H; Jiukai, Z; Sun, Cd; Xian, L; Kunsong, C. 2012. Quantification and Purification of Mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars and Its Protective Effect on Human Umbilical Vein Endothelial Cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 13(2): 11260-11274.

Figueroa Hurtado, JG; Armijos Piedra, MA; Pérez Cuenca, EL. 2012. Efecto del tamaño de partícula sobre la capacidad antioxidante de un subproducto de guayaba (*Psidium guajava* L.) *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3. Consultado. Disponible en.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. Glosario sobre el cambio climático y bioenergía (en línea). Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Consultado 7 mar. 2013. Disponible en <http://foris.fao.org/static/data/nrc/CCpdfglossary.pdf>

Fundación Mango Ecuador. 2000. Áreas de Cultivo (en línea). Guayaquil. Consultado 17 oct. 2012. Disponible en <http://www.mangoecuador.org/areas-cultivo.php>.

Goñi, I; Hervert-Hernández, D. 2011. By-Products from Plant Foods are Sources of Dietary Fibre and Antioxidants (Type of Medium). City. Consultado. Disponible en <http://www.intechopen.com/books/statistics/phytochemicals-bioactivities-and-impact-on-health/by-products-from-plant-foods-are-sources-of-dietary-fibre-and-antioxidants>.

Gourgue, CM; Champ, MM; Lozano, Y; Delort-Laval, J. 1992. Dietary fiber from mango byproducts: Characterization and hypoglycemic effects determined by in vitro methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40(10): 1864–1868.

Griesbach, J. 2003. Mango growing in Kenya (en línea). Nairobi. Consultado 5 abr. 2013. Disponible en <http://www.worldagroforestry.org/units/Library/books/Book%2097/Mango%20Growing%20in%20Kenya/html/index.htm>.

Gutiérrez Pullido, H; Vara Salazar, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. Segunda Edición. México, Mc Graw Hill. 545.

Guyot, S; Marnet, N; Sanoner, P; Drilleau, J-F. 2003. Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51(21): 6240–6247.

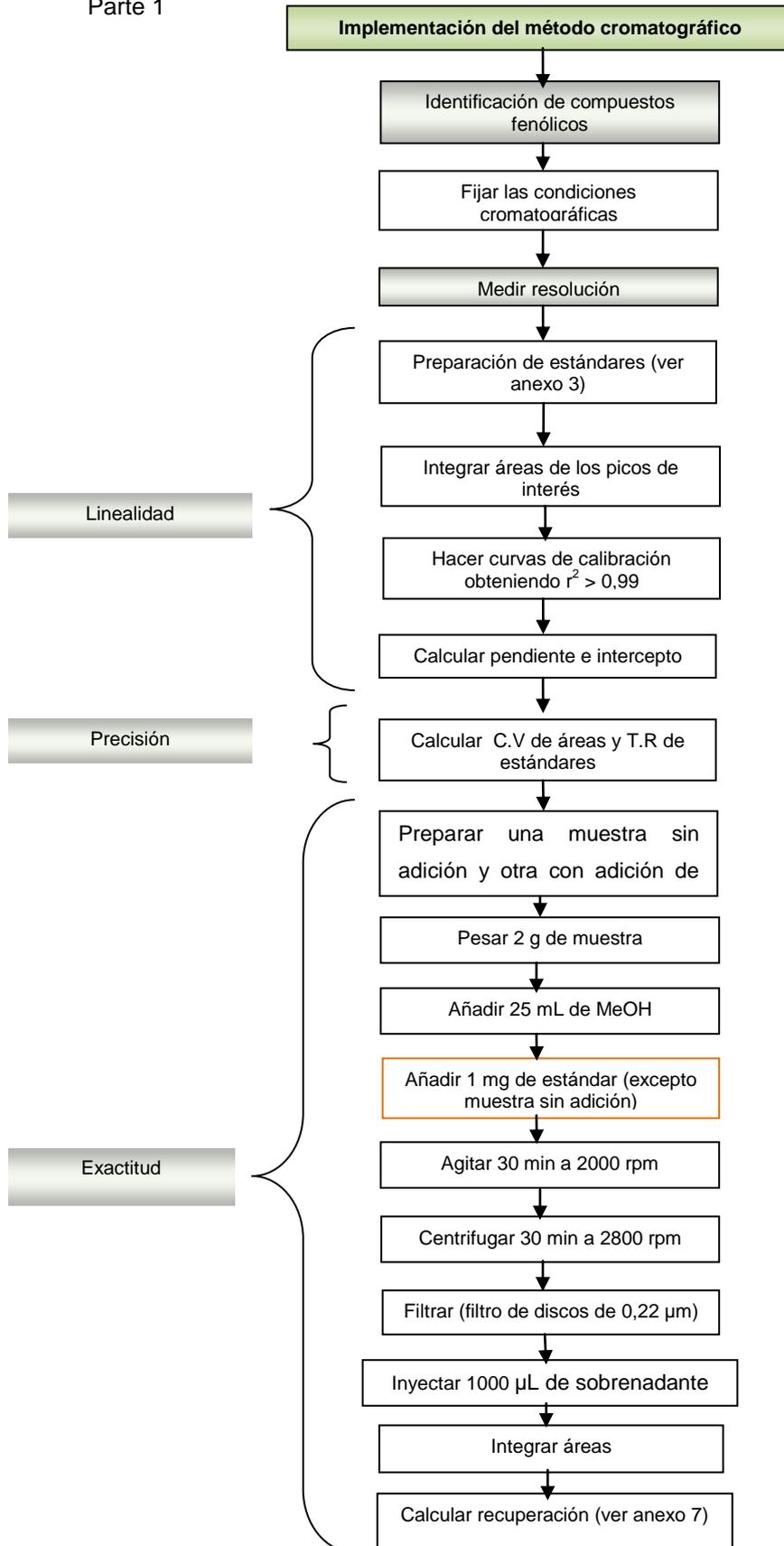
- Harris, DC. 2007. Análisis químico cuantitativo. Tercera Edición. New York Reverté. 549.
- Kaur, C; Kapoor, HC. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology* 36(7): 703–725.
- Lee, J-H; Talcott, ST. 2004. Fruit Maturity and Juice Extraction Influences Ellagic Acid Derivatives and Other Antioxidant Polyphenolics in Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52(2): 361–366.
- Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; Rémésy, C; Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727–747.
- Masibo, M; He, Q. 2008. Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Food Science & Technology* 7(4): 309–319.
- McMaster, MC. 2007. HPLC A practical User's Guide. Segunda. New Jersey, A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 237.
- Montgomery, DC; Runger, GC. 2007. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. Segunda Edición. México Limusa Wiley. 817.
- Nantitanon, W; Yotsawimonwat, S; Okonogi, S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *Food Science and Technology* 43(7): 1095-1103.
- Nielsen, S. 2003. Análisis de los alimentos: Manual de laboratorio. Zaragoza, Acribia, S.A. 160.
- Nuñez Sellés, AJ; Vélez Catro, H; Aguero Aguero, J; Gonzáles Gonzáles, J; Naddeo, F; Simone, F; Rastrelli, L. 2002. Isolation and Quantitative Analysis of Phenolic Antioxidants, Free Sugars, and Polyols from Mango (*Mangifera indica* L.) Stem Bark Aqueous Decoction Used in Cuba as a Nutritional Supplement. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50(4): 762-766.
- Pinto, MdC; Duque, AL; Macías, P. 2011. Fluorescence Quenching Study on the Interaction between Quercetin and Lipoxygenase. *J Fluoresc* 21(3): 1311–1318.
- Qin, J; Deng, J; Feng, X; Wang, Q; Wang, S. 2008. Quantitative RP–LC Analysis of Mangiferin and Homomangiferin in *Mangifera indica* L. Leaves and in *Mangifera persiciforma* C.Y. Wu et T.L. Ming Leaves. *Chromatographia* 68(11-12): 955–960.
- Ribeiro, SMR; Barbosa, LCA; Queiroz, JH; Knodler, M; Schieber, A. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* 110(3): 620–626.

- Rivera Orozco, CA; Rodríguez Báez, MdR; S.C, Bdi. 2010. Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006 (en línea). México. Centro Nacional de Metrología. Consultado 14 abr. 2013. Disponible en <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>.
- Rodríguez Osuna, J; Ferreras, ML; Núñez, A. 2000. Inferencia estadística, niveles de precisión y diseño muestral (en línea). Madrid. Consultado 13 abr. 2013. Disponible en <http://www.jstor.org/discover/10.2307/40183521?uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21102489163931>.
- Samee, W; Vorarat, S. 2007. Simultaneous Determination of Gallic acid, Catechin, Rutin, Ellagic Acid and Quercetin in Flower Extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera* by HPLC. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal* 2(2): 131-137.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Compuestos polifenólicos: Efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. Madrid, ESPAÑA, Eypasa.
- Schieber, A; Ullrich, W; Carle, R. 2000. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1(2): 161-166.
- Sierra Alonso, I; Pérez Quintanilla, D; Gómez Ruiz, S; Morante Zarcero, S. 2010. Análisis Instrumental. Primera edición. España, Netbiblo. 538.
- Skoog, DA; Holler, JF; Nieman, TA. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. España, Mc Graw Hill. 1028.
- Soong, Y-Y; Barlow, PJ. 2006. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry* 97(3): 524–530.
- Ureña Bogantes, AL; González Rojas, JM; Meneses Contreras, R; Alvarado Barrantes, E. 2007. Agrocadena del Mango (en línea). Alajuela, GR. Ministerio de Agricultura y Ganadería Consultado 13 abr. 2013. Disponible en <http://www.yumpu.com/es/document/view/5819258/agrocadena-de-mango-ministerio-de-agricultura-y-ganaderia>.
- Venereo Gutiérrez, JR. 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana Medica Militar* 31(2): 126-133.

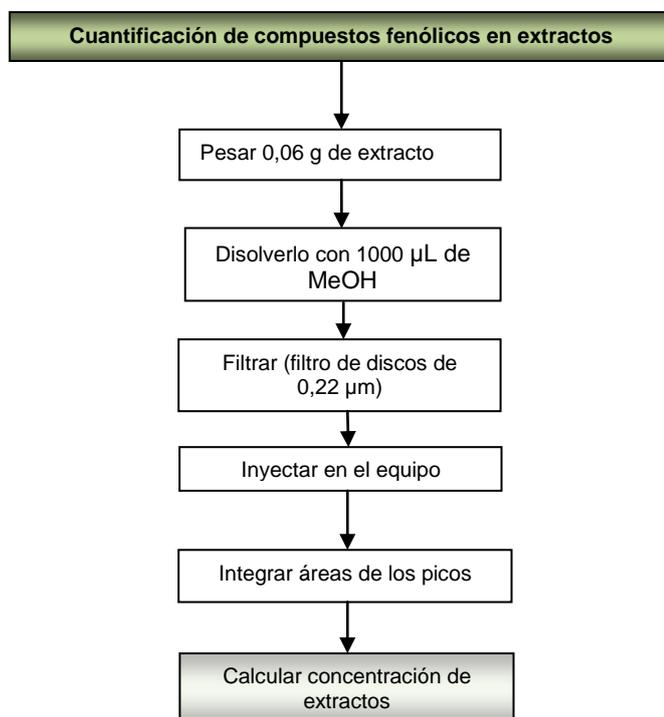
## ANEXOS

### Anexo 1. Diagrama de flujo del método

#### Parte 1



Parte 2.



## Anexo 2. Condiciones del método cromatográfico.

Tipo de columna	Columna empacada C18 de fase reversa con diámetro 4,6 mm x 250 mm con diámetro interno de 5 µm
Fases móviles	Fase A : ácido acético – agua en proporción (2:98, v/v) Fase B: la mezcla (0,5:95,5 v/v) ácido acético – agua con acetonitrilo en proporción (50:50, v/v).
Flujo	1 mL/min
Volumen de Inyección	20 uL
Temperatura de horno de la columna	20°C
Longitud de onda inicial	200 nm
Longitud de onda final	600 nm
Longitud de onda de lectura	270 nm
Velocidad de muestreo	1 spectra/s
Duración de la corrida	65 min

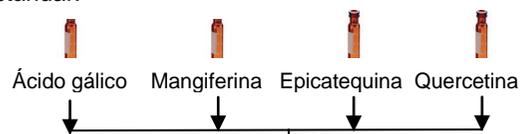
### Gradiente del método

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	95	5
15	90	10
20	60	40
55	45	55
65	20	80

### Anexo 3. Preparación de estándares

#### 1. Soluciones patrón

Pesar 0,001 g aproximadamente de cada estándar y disolverlos con 1000  $\mu$ L de metanol, se obtendrá una concentración con respecto a la riqueza de cada estándar.



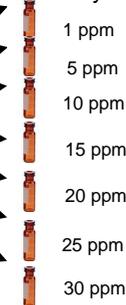
#### 2. Solución mix

Tomar un volumen necesario de cada estándar y aforarlo con metanol para tener una concentración de 100 ppm y un volumen final de 2000  $\mu$ L.



#### 3. Preparación de concentraciones

Preparar las concentraciones especificadas tomando de la solución mix el volumen necesario para llegar a tener la concentración de 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ppm para mangiferina, epicatequina y quercetina y de 1, 5, 25, 50, 100, 150 y 200 ppms para ácido gálico, aforando con metanol a un volumen final de 1000  $\mu$ L e inyectar en el equipo.



Preparación de soluciones patrón				
Compuesto	W (g)	Pureza (%)	Af. MeOH ( $\mu$ L)	Conc (ppm)
Ácido gálico	0,001	98,5	1000	1015
Mangiferina	0,001	98	1500	653
Epicatequina	0,001	98	1000	1009
Quercetina	0,001	97	1000	999

Preparación de solución mix			
V inicial ( $\mu$ L)	Conc (ppm)	V final ( $\mu$ L)	Af. con MeOH ( $\mu$ L)
2000	100	197	1098
		306	
		198	
		200	

Preparación de concentraciones			
Conc. (ppm)	V inicial ( $\mu$ L)	V final ( $\mu$ L)	Af. MeOH ( $\mu$ L)
1	1000	10	990
5	1000	50	950
10	1000	100	900
15	1000	150	850
20	1000	200	800
25	1000	250	750
30	1000	300	700

\*Por su difícil disolución utilizar el vórtex en la preparación de mangiferina

Donde:

**Af. MeOH:** aforo con metanol

**W:** peso

**Conc:** concentración

**V. inicial:** volumen inicial

**V. final:** volumen final

### 1. Soluciones patrón

0,001g de ácido gálico x 1000  $\mu$ L = 1,03 g/ $\mu$ L

1,03 g/ $\mu$ L x (98,5%  $\div$  100) = 1,03 g/ $\mu$ L

1,03 g/ $\mu$ L  $\frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 1015 \text{ g/mL (ppm)}$

### 2. Solución mix

$C1 \times V1 = C2 \times V2$

$C1 = 100 \text{ ppm}$

$C2 = 1015 \text{ ppm}$

$V1 = 2000 \mu\text{L}$

$V2 = ?$

$$V2 = \frac{C1 \times V1}{C2}$$

$$V2 = \frac{100 \text{ ppm} \times 2000 \mu\text{L}}{1015 \text{ ppm}}$$

$V2 = 197 \mu\text{L}$

### 3. Preparación de concentraciones

$C1 = 1 \text{ ppm}$

$C2 = 100 \text{ ppm}$

$V1 = 1000 \mu\text{L}$

$V2 = ?$

$$V2 = \frac{1 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{L}}{100 \text{ ppm}}$$

$V2 = 10 \mu\text{L}$

**Anexo 4.** Linealidades de compuestos fenólicos.

## Ácido gálico

Conc. (ppm)	Linealidad 1			Linealidad 2			Linealidad 3			Prom. Áreas	Prom. TR (min)	% C.V Áreas	% C.V TR
	Área	TR (min)	Residuo	Área	TR (min)	Residuo	Área	TR (min)	Residuo				
1	914	5,54	2415	937	5,70	4674	1193	5,72	600	1015	5,65	5,09	1,75
5	4946	5,54	2045	5076	5,60	4030	4694	5,66	1212	4905	5,60	3,96	1,07
25	25623	5,54	-319	25950	5,58	629	27591	5,64	-1121	26388	5,59	4,00	0,90
50	48158	5,59	36	47236	5,56	1184	50685	5,65	1490	48693	5,60	3,67	0,82
100	96643	5,63	-2668	101406	5,57	-9303	107138	5,64	-3553	101729	5,61	5,17	0,67
150	141389	5,65	-1632	138651	5,56	-2865	153161	5,66	1835	144400	5,62	5,34	0,98
200	183000	5,76	2538	173145	5,53	6324	206269	5,77	137	187471	5,69	9,07	2,39

\*La parte sombreada es el rango que presenta repetibilidad

\*Con los datos de linealidad 3 se determinaron las concentraciones de los extractos.

## Mangiferina

Conc. (ppm)	Linealidad 1			Linealidad 2			Linealidad 3			Prom. Áreas	Prom. TR (min)	% C.V Áreas	% C.V TR
	Área	TR (min)	Residuo	Área	TR (min)	Residuo	Área	TR (min)	Residuo				
1	280	25,62	-294	525	25,62	-1094	527	25,68	-310	444	25,64	31,99	0,14
5	2014	25,63	75	2459	25,61	-331	2712	25,67	-181	2395	25,64	14,75	0,12
10	4676	25,64	42	5692	25,59	-191	5297	25,64	125	5222	25,62	9,81	0,11
15	7432	25,65	-85	8615	25,60	258	8188	25,64	126	8078	25,63	7,42	0,10
20	10208	25,65	-232	11839	25,60	406	11344	25,62	-138	11130	25,62	7,51	0,10
25	12428	25,65	176	14784	25,60	833	13794	25,61	303	13669	25,62	8,65	0,10
30	15209	25,65	24	19964	25,60	-975	17224	25,61	-235	17466	25,62	13,67	0,10

\*La parte sombreada es el rango que presenta repetibilidad

## Epicatequina

Conc. (ppm)	Linealidad 1			Linealidad 2			Linealidad 3			Prom. Áreas	Prom. TR (min)	% C.V Áreas	% C.V TR
	Área	TR (min)	Residuo	Área	TR (min)	Residuo	Área	TR (min)	Residuo				
1	108	26,04	-100	184	26,04	-391	171	26,11	-109	154	26,06	26,34	0,16
5	648	26,06	37	857	26,01	-113	771	26,09	-73	759	26,05	13,85	0,16
10	1545	26,05	-13	1997	25,99	-64	1505	26,06	-11	1682	26,03	16,24	0,15
15	2399	26,07	-20	3036	26	86	2123	26,04	167	2519	26,04	18,59	0,13
20	3299	26,07	-73	4176	26	135	3158	26,02	-72	3544	26,03	15,56	0,14
25	4006	26,07	67	5206	26	294	3835	26,01	47	4349	26,03	17,18	0,15
30	4920	26,06	0	7026	26	-337	4738	26,02	-60	5561	26,03	22,87	0,12

\*La parte sombreada es el rango que presenta repetibilidad

## Quercetina

Conc. (ppm)	Linealidad 1			Linealidad 2			Linealidad 3			Prom. Áreas	Prom. TR (min)	% C.V Áreas	% C.V TR
	TR			TR			TR						
	Área	(min)	Residuo	Área	(min)	Residuo	Área	(min)	Residuo				
1	487	47,47	-263	715	47,41	-331	1029	47,84	-166	744	47,57	36,59	0,49
5	2657	47,51	303	3331	47,29	495	4649	47,65	205	3546	47,48	28,58	0,38
10	6250	47,52	131	8193	47,28	-64	9789	47,58	55	8077	47,46	21,94	0,33
15	9973	47,54	-171	12533	47,25	-101	14927	47,52	-94	12478	47,44	19,86	0,34
20	13761	47,53	-538	17248	47,22	-513	20897	47,48	-1074	17302	47,41	20,62	0,35
25	16822	47,52	-178	21486	47,2	-448	25345	47,46	-533	21218	47,39	20,11	0,36
30	20666	47,51	-601	28928	47,2	-3587	31227	47,42	-1426	26940	47,38	20,62	0,34

\*La parte sombreada es el rango que presenta repetibilidad

**Donde:**

**Conc (ppm):** Concentración en ppm.

**TR:** Tiempo de Retención.

**Prom. Áreas:** Promedio de las áreas

**Prom. TR(min):** Promedio de los tiempos de retención en minutos

**% C.V Áreas:** Coeficiente de Variación de las áreas.

**% C.V TR (min):** Coeficiente de Variación de los tiempos de retención en minutos

### **Cálculos**

La linealidad 1 del ácido gálico tiene como ecuación:

$$y = 915,62 x + 2413,09$$

*Pendiente:* 915,62

*Intercepto:* 2413,09

### **Residuos**

*Residuo = (concentración \* pendiente) + (intercepto - área)*

$$\text{Residuo} = (1 \text{ ppm} * 915,62) + (2413,09 - 914)$$

$$\text{Residuo} = 2415$$

### **Coeficiente de variación de las áreas**

La fórmula es la siguiente:

$$\%CV = \frac{\sigma}{X} * 100$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar y X el promedio.

El promedio es:

$$X = \frac{\sum x_1 + x_2 + \dots}{n}$$

Donde: la sumatoria de los datos de las áreas se las divide para el número de datos de las áreas (n=3).

$$X = \frac{914 + 937 + 1193}{3}$$

$$X = 1015$$

La desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$
$$\sigma = \sqrt{\frac{(914-1015)^2}{3-1} + \frac{(937-1015)^2}{3-1} + \frac{(1193-1015)^2}{3-1}}$$

$$\sigma = 52$$

Entonces:

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

$$\%CV = \frac{52}{1015} * 100$$

$$\%CV = 5,09\%$$

#### ***Coefficiente de variación de los tiempos de retención***

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

$$\%CV = \frac{0,10}{5,65} * 100$$

$$\%CV = 1,75$$

**Anexo 5.** Cálculos de resolución.

Variaciones	Ancho del pico mangiferina				Ancho del pico epicatequina				Resolución
	Inicio	Fin	Diferencia del Wm	TR (min)	Inicio	Fin	Diferencia del Wm	TR (min)	
1				Coeluyen					0
2				Coeluyen					0
3	28,36	29,01	0,65	28,82	29,01	29,39	0,38	29,11	0,56
4	26,55	26,97	0,42	26,80	26,97	27,32	0,35	27,15	0,91
5	25,40	25,85	0,45	25,63	26,04	26,34	0,30	26,04	1,09
6	22,32	22,59	0,27	22,50	22,74	22,91	0,17	22,88	1,73

**Cálculos de resolución**

Para calcular la resolución la fórmula es:

$$\text{Resolución} = \frac{\Delta TR}{\frac{1}{2} Wm}$$

Donde  $\Delta TR$  es la variación de los tiempos de retención y  $Wm$  son los anchos de pico (los inicios y finales de las integraciones automáticas de las áreas de cada pico).

$$\text{Resolución} = \frac{22,88 - 22,50}{\frac{1}{2} * (22,59 - 22,32) + (22,91 - 22,74)}$$

$$\text{Resolución} = \frac{0,38}{\frac{1}{2} * (0,27 + 0,17)}$$

$$\text{Resolución} = 1,73$$

**Anexo 6.** Linealidad para lectura de extractos

Conc. (ppm)	Ácido gálico		Concentración (ppm)	Mangiferina		Epicatequina		Quercetina	
	Área	TR		Área	TR	Área	TR	Área	TR
1	914	5,54	1	569	22,51	153	22,89	744	38,86
5	4946	5,54	5	3389	22,5	904	22,9	3769	38,81
25	25623	5,54	10	8112	22,49	2180	22,89	9562	38,83
50	48158	5,59	15	13991	22,5	3698	22,88	15923	38,78
100	96643	5,63	20	16857	22,48	4360	22,87	18682	38,73
150	141389	5,65	25	20776	22,49	5363	22,87	23166	38,7
200	183000	5,66	30	25150	22,5	6597	22,89	27900	38,72
Promedio TR		5,59	Promedio TR		22,5		22,88		38,78
%C.V. TR	0,97		%C.V. TR	0,04		0,01		0,16	
Pendiente	920,73		Pendiente	855,9		222,08		944,17	
Intercepto	1680,47		Intercepto	-268,78		-40,71		-48,03	

\*Para la lectura de extractos de ácido gálico se trabaja con la linealidad 3.

\*La parte sombreada es la que presenta repetibilidad

**Cálculos de % C.V. T.R**

$$\% \text{ C.V. T.R} = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

$$\% \text{ C.V. T.R} = \frac{0,009}{22,501} * 100\%$$

$$\% \text{ C.V. T.R (mangiferina)} = 0,04 \%$$

**Anexo 7. Cálculos de exactitud.**

Repetición	W. Muestra (g)	W. Estándar (g)	Vol. aforo MeOH (mL)	Área	Concentración (ppm)	% Recuperación
1	2,007			21666	25,63	60
2	2,009	0,001		18279	21,67	50
3	2,002		25	18345	21,75	50
Muestra sin adición	2,018			1548	2,12	
Pendiente	855,90					
Intercepto	-268,78					
Prom. Rec	52,97					
Desv.Est.Rec	5,74					
% C.V Rec.	10,83					

\*Se trabajo con la pendiente e intercepto de linealidad que se determinó la concentración de los extractos.

**Cálculos de la recuperación de mangiferina**

$$\text{Conc} = \frac{\text{Área} - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Conc} = \frac{21666 - (-268,78)}{855,90}$$

$$\text{Conc} = 25,63 \text{ ppm}$$

**Recuperación:**

$$\% R = \frac{CF - CU}{CA} * 100$$

Donde:

CF = Concentración del analito medida en la muestra fortificada

CU = Concentración de analito medida en la muestra sin fortificar

CA = Concentración de analito adicionada (Harris 2007).

$$CU = \frac{0,001g}{25ml} \times \frac{1000mL}{1L} \times \frac{1000mg}{1g} \times 0,98 = 39 \text{ ppm}$$

0,98 es el porcentaje de riqueza de la mangiferina añadida.

$$\%R = \frac{25,63 \text{ ppm} - 2,12 \text{ ppm}}{39 \text{ ppm}} \times 100\%$$

$$\%R = 60\%$$

**Anexo 8.** Cálculos señal - ruido.

Áreas								
Compuesto	Área Pico anterior	TR (min)	Área Pico de interés	TR (min)	Área Pico posterior	TR (min)	Señal - ruido pico anterior	Señal - ruido pico posterior
Ácidogálico	32127	5,01	153150	5,47	2307	6,34	4,77	66,38
Mangiferina	3202	24,31	11616	24,86	51747	25,26	3,63	0,22
Quercetina	3043	36,07	9772	38,92	166	39,31	3,21	58,87

**Cálculos de la señal - ruido**

Por ejemplo para ácido gálico

$$\text{Señal-ruido} = \frac{\text{Área del pico de interés}}{\text{Área del pico posterior}}$$

$$\text{Señal-ruido} = \frac{153150}{32127}$$

$$\text{Señal-ruido} = 4,77$$

$$\text{Señal-ruido} = \frac{\text{Área del pico de interés}}{\text{Área del pico posterior}}$$

$$\text{Señal-ruido} = \frac{153150}{2307}$$

$$\text{Señal-ruido} = 66,38$$

## Anexo 9. Nomenclatura asignada a los extractos.

### Lectura extractos

Donde:

**W<sub>o</sub>**: peso del subproducto para la extracción.

**W ext**: peso del extracto.

**W. ext a**: Peso del extracto para la cuantificación en el HPLC.

**Vol (mL)**: volumen con el que se aforó al extracto para la cuantificación (metanol).

**TR (min)**: Tiempo de retención en minutos

**Conc**: Concentración.

**% C.V Conc (mg/kg)**: Coeficiente de variación de la concentración final de cada extracto.

**Prom. Conc (mg/kg)**: Promedio de la concentración final de cada extracto.

**% C.V TR**: Coeficiente de variación del tiempo de retención de cada extracto.

**Prom. TR**: Promedio del tiempo de retención de cada extracto.

La codificación de los extractos es la siguiente:

- Tamaño de partícula:

A. >500  $\mu\text{m}$

B. >355  $\leq$ 500  $\mu\text{m}$

C. >250  $\leq$ 355  $\mu\text{m}$

D. >125  $\leq$ 250  $\mu\text{m}$

E. <125  $\mu\text{m}$

- Repeticiones codificadas por:

1, 2 y 3

\*Los resultados se encuentran expresados en peso fresco.

**Anexo 10.** Determinación de ácido gálico en los subproductos de mango

## Ácido gálico

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 3 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente		1028,21	W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intercepto		764,45											
EXTRACTO	Wo (g)												
A1	10,068	2,589	0,060	1,5	5,46	105228	102	652	4,05	632	0,28	5,47	
A2	10,015	2,595	0,060		5,47	97183	94	605					
A3	10,015	2,564	0,060		5,49	104524	101	644					
B1	10,007	2,541	0,060		5,48	75115	72	462	17,07	456	0,11	5,47	
B2	10,036	3,065	0,060		5,47	51802	50	388					
B3	10,026	2,895	0,060		5,47	77028	74	539					
C1	10,048	2,503	0,060		5,48	65326	63	395	2,94	401	0,18	5,47	
C2	10,043	2,618	0,060		5,47	65799	63	419					
C3	10,054	2,496	0,060		5,46	67433	65	409					
D1	10,032	2,547	0,060		5,47	95730	93	587	7,89	618	0,18	5,47	
D2	10,092	2,609	0,060		5,48	95717	93	599					
D3	10,090	2,570	0,060		5,46	109894	106	674					
E1	10,038	2,585	0,060		5,48	103638	100	645	12,22	627	0,28	5,46	
E2	10,003	2,558	0,060		5,45	88458	86	547					
E3	10,039	2,564	0,060		5,46	113119	109	694					

## Ácido gálico

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 6 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente		1028,21		W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (ppm)	% C.V Conc. F	Prom. Conc.F	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intercepto		764,45												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,023	2,422	0,060	1,5	5,48	157643	153	918	10,89	954	0,18	5,47		
A2	10,020	2,380	0,060		5,46	186769	181	1074						
A3	10,080	2,434	0,060		5,47	149794	145	872						
B1	10,069	2,402	0,060		5,46	57712	55	330	7,19	351	0,00	5,46		
B2	10,011	2,674	0,060		5,46	59445	57	379						
B3	10,027	2,655	0,060		5,46	54736	52	345						
C1	10,008	2,646	0,060		5,48	98013	95	624	16,32	604	0,11	5,48		
C2	10,082	2,598	0,060		5,48	80141	77	497						
C3	10,082	2,640	0,060		5,47	109799	106	691						
D1	10,010	2,042	0,060		5,54	159216	154	783	25,17	734	0,10	5,54		
D2	10,010	2,266	0,060		5,55	97702	94	530						
D3	10,020	2,343	0,060		5,54	157451	152	890						
E1	10,043	2,327	0,060		5,57	135164	131	756	3,29	736	0,21	5,56		
E2	10,050	2,300	0,060		5,55	128558	124	709						
E3	10,005	2,358	0,060		5,57	130493	126	743						

## Ácido gálico

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 24 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente 1028,21		W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección 764,45												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,049	2,582	0,060	1,5	5,58	60613	58	374	17,07	312	1,15	5,51
A2	10,054	2,664	0,060		5,47	43571	42	275				
A3	10,008	2,360	0,060		5,47	51364	49	289				
B1	10,013	2,562	0,060		5,47	68915	66	423	4,24	433	0,11	5,47
B2	10,077	2,524	0,060		5,46	70108	67	422				
B3	10,096	2,567	0,060		5,47	74673	72	455				
C1	10,059	2,439	0,060		5,47	54497	52	316	67,16	255	0,00	5,47
C2	10,010	2,440	0,060		5,47	66421	64	388				
C3	10,018	2,547	0,060		5,47	10768	10	62				
D1	10,086	2,510	0,060		5,46	70086	67	419	8,58	431	0,21	5,45
D2	10,020	2,726	0,060		5,46	72538	70	473				
D3	10,021	2,820	0,060		5,44	59609	57	402				
E1	10,006	2,534	0,060		5,46	39780	38	240	23,48	286	0,11	5,46
E2	10,001	2,791	0,060		5,47	38576	37	255				
E3	10,020	2,592	0,060		5,46	58726	56	363				

## Ácido gálico

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 3 horas  
Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente	1028,21	W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc.F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección	764,45											
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,068	2,846	0,060	1,5	5,47	11810	11	75	18,61	65	0,21	5,46
A2	10,015	2,920	0,060		5,45	10554	10	69				
A3	10,015	2,735	0,060		5,45	8620	8	52				
B1	10,075	2,584	0,060		5,45	3692	3	18	31,91	15	0,18	5,44
B2	10,036	2,565	0,060		5,44	3610	3	18				
B3	10,007	2,764	0,060		5,43	2189	1	10				
C1	10,048	2,532	0,060		5,43	5954	5	32	19,05	37	0,00	5,43
C2	10,043	2,589	0,060		5,43	6181	5	34				
C3	10,054	2,664	0,060		5,43	7723	7	45				
D1	10,038	2,819	0,060		5,37	7719	7	47	4,36	50	0,80	5,42
D2	10,003	2,803	0,060		5,45	8309	7	51				
D3	10,039	2,812	0,060		5,44	8113	7	50				
E1	10,038	2,687	0,060		5,44	18804	18	117	42,62	79	0,18	5,45
E2	10,003	2,857	0,060		5,45	10381	9	66				
E3	10,039	2,812	0,060		5,46	8576	8	53				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Ácido gálico

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 6 horas  
Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente 1028,21		W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección 764,45												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,029	2,535	0,060	1,5	5,47	11810	11	75	18,61	65	0,21	5,46
A2	10,020	2,446	0,060		5,45	10554	10	69				
A3	10,080	2,594	0,060		5,45	8620	8	52				
B1	10,069	3,225	0,060		5,45	3692	3	18	31,91	15	0,18	5,44
B2	10,011	3,320	0,061		5,44	3610	3	18				
B3	10,027	2,975	0,060		5,43	2189	1	10				
C1	10,008	3,168	0,060		5,43	5954	5	32	19,05	37	0,00	5,43
C2	10,082	2,780	0,060		5,43	6181	5	34				
C3	10,082	2,588	0,061		5,43	7723	7	45				
D1	10,010	2,202	0,061		5,37	7719	7	47	4,36	50	0,80	5,42
D2	10,010	2,643	0,060		5,45	8309	7	51				
D3	10,020	2,242	0,060		5,44	8113	7	50				
E1	10,043	2,443	0,060		5,44	18804	18	117	42,62	79	0,18	5,45
E2	10,050	2,435	0,060		5,45	10381	9	66				
E3	10,005	2,425	0,060		5,46	8576	8	53				

## Ácido gálico

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 24 horas  
Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente 1028,21		W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección 764,454	Wo (g)											
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,049	2,012	0,060	1,5	5,30	66168	64	400	20,81	370	0,22	5,31
A1	10,054	2,098	0,060		5,30	73250	70	427				
A3	10,008	2,038	0,060		5,32	46049	44	282				
B1	10,013	2,581	0,065		5,33	1651	1	7	130,85	25	0,71	5,30
B2	10,054	2,523	0,060		5,32	1459	1	6				
B3	10,096	2,550	0,060		5,26	9621	9	64				
C1	10,059	2,263	0,060		5,34	27627	26	206	85,03	104	0,22	5,33
C2	10,010	2,614	0,060		5,32	9440	8	58				
C3	10,035	2,564	0,060		5,32	8523	8	48				
D1	10,002	2,241	0,060		5,41	10298	9	50	109,29	157	1,19	5,34
D2	10,020	2,594	0,064		5,30	10975	10	66				
D3	10,021	2,673	0,060		5,30	66350	64	355				
E1	10,006	2,388	0,060		5,25	29705	28	171	35,94	121	1,04	5,31
E2	10,001	2,729	0,060		5,35	18284	17	103				
E3	10,010	2,656	0,060		5,34	16073	15	90				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Ácido gálico

Método de extracción: Soxhlet

Tiempo de extracción: 4 horas

Solvente de extracción: Etanol

Pendiente 1028,21		W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección 764,45												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	5,007	1,370	0,060	1,5	5,50	171110	166	1133	29,17	849	0,28	5,48
A1	5,008	2,000	0,061		5,48	71413	69	680				
A3	5,005	1,365	0,060		5,47	111897	108	734				
B1	5,006	2,535	0,060		5,47	57226	55	693	28,25	536	10,95	5,14
B2	5,008	1,730	0,060		5,46	47295	45	391				
B3	5,002	1,994	0,060		4,49	55098	53	525				
C1	1,701	0,534	0,060		4,77	10929	10	77	12,72	88	1,65	4,85
C2	1,701	0,674	0,060		4,84	11123	10	100				
C3	1,701	0,617	0,060		4,93	10687	10	87				
D1	5,001	1,604	0,060		5,31	66916	64	513	19,59	504	0,81	5,36
D2	5,003	1,573	0,060		5,38	79181	76	597				
D3	5,002	1,325	0,060		5,39	63324	61	401				
E1	1,702	0,968	0,060		5,48	22005	21	293	6,97	294	0,48	5,49
E2	1,701	0,514	0,060		5,47	43971	42	316				
E3	1,701	0,837	0,060		5,52	23754	22	275				

## Ácido gálico

Método de extracción: Soxhlet

Tiempo de extracción: 4 horas

Solvente de extracción: Metanol

Pendiente		1028,21		W ext (g)	W ext a (g)	Vol (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección		764,45												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	5,007	1,359	0,060	1,5	5,40	15613	14	98	17,50	118	0,00	5,40		
A1	5,008	1,602	0,060		5,40	18662	17	139						
A3	5,005	1,409	0,060		5,40	18136	17	118						
B1	5,006	0,472	0,060		5,41	16405	15	36	38,94	56	0,18	5,41		
B2	5,008	1,095	0,061		5,40	10780	10	53						
B3	5,002	1,195	0,060		5,42	14325	13	79						
C1	1,701	0,292	0,060		5,42	3521	3	11	31,57	8	0,21	5,43		
C2	1,701	0,200	0,060		5,44	3222	2	7						
C3	1,701	0,197	0,060		5,42	3179	2	7						
D1	5,001	0,809	0,060		5,39	13708	13	51	25,53	43	0,19	5,40		
D2	5,003	1,150	0,060		5,40	6201	5	30						
D3	5,002	1,011	0,060		5,41	10506	9	48						
E1	1,702	0,079	0,061		5,41	19798	19	21	43,67	35	1,29	5,37		
E2	1,701	0,283	0,060		5,29	13423	12	51						
E3	1,701	0,163	0,060		5,41	14581	13	32						

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

**Anexo 11.** Cálculos de los extractos de ácido gálico, mangiferina y quercetina.

### **Cálculos**

Se toma como ejemplo el primer valor de ácido gálico

$$\text{Conc (ppm)} = \frac{\text{Área} - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Conc} = \frac{105228 - 764,45}{1028,21}$$

Conc= 102 ppm

$$\text{-Conc (mg/kg)} = \frac{102\text{ppm} \times 1,5\text{mL}}{1000 \text{ L}} \times \frac{2,589\text{g}}{0,060\text{g}} \times \frac{1000\text{g}}{10,068\text{g}}$$

Conc= 651 mg/kg

-Para el promedio de las áreas y tiempos de retención de las tres repeticiones para cada extracto se utiliza la fórmula:

$$X = \frac{\sum x_1 + x_2 + \dots}{n}$$

Donde:

La sumatoria de los datos de las áreas se las divide para el número de datos de las áreas (n=3), de igual forma para los tiempos de retención.

-Para %C.V de las áreas y tiempos de retención de las tres repeticiones para cada extracto se utiliza la fórmula:

$$\%C.V = \frac{\sigma}{X} * 100$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar y X el promedio.

## Anexo 12. Análisis estadístico de ácido gálico.

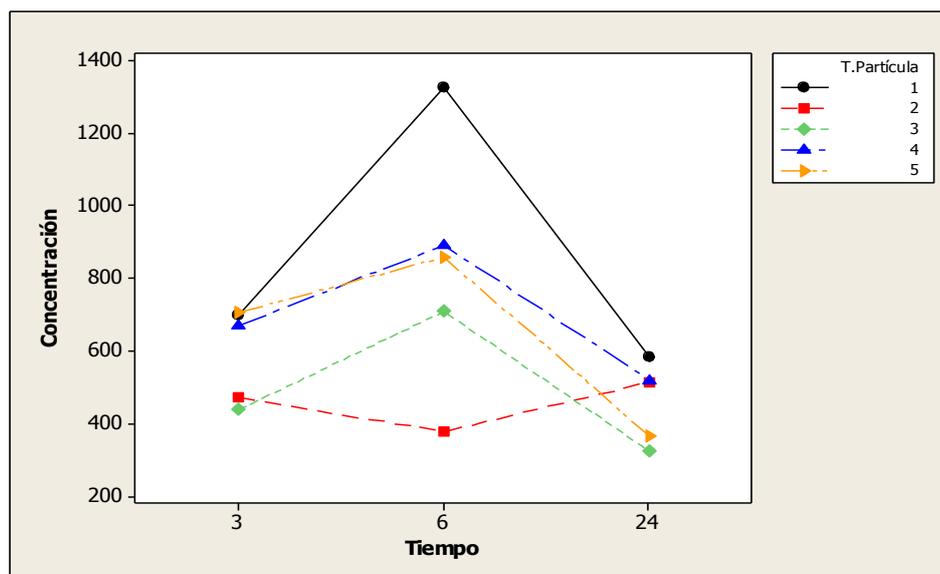
Donde el tamaño de partícula corresponde a:

- 1) >500  $\mu\text{m}$
- 2) >355  $\leq$ 500  $\mu\text{m}$
- 3) >250  $\leq$ 355  $\mu\text{m}$
- 4) >125  $\leq$ 250  $\mu\text{m}$
- 5) <125  $\mu\text{m}$

### Método: Maceración dinámica

Solvente de extracción: Sumatoria etanol + metanol

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		600,8	39,67	15,15	0,000
T.Partícula		-52,1	56,10	-0,93	0,359
Tiempo		-119,6	43,36	-2,76	0,009
T.Partícula*Tiempo		-42,0	61,33	-0,68	0,497



### Método: Soxhlet

Solvente de extracción: Sumatoria etanol + metanol

#### One-way ANOVA: Concentración versus T. Partícula

Source	DF	SS	MS	F	P
T.Partícula	4	1263176	315794	19,20	0,000
Error	10	164511	16451		
Total	14	1427687			

**Anexo 13.** Análisis estadístico de ácido gálico con respecto al método de extracción.

**Diferencia entre maceración dinámica y Soxhlet**

**Solvente:** Sumatoria de etanol + metanol

**One-way ANOVA: Concentración versus Tiempo**

Source	DF	SS	MS	F	P
Tiempo	1	535294	535294	18,36	0,013
Error	4	116620	29155		
Total	5	651914			

**Anexo 14.** Determinación de mangiferina en los subproductos de mango.

## Mangiferina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 3 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente		855,90		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (ppm)	% C.V Conc. F	Prom. Conc. F	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección		-253,80												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,068	2,589	0,060	1,5	24,96	9570	11	74	13,88	84	0,02	24,97		
A1	10,015	2,595	0,060		24,97	10744	13	83						
A3	10,015	2,564	0,060		24,97	12745	15	97						
B1	10,007	2,541	0,060		24,96	11685	14	88	17,56	110	0,06	24,95		
B2	10,036	3,065	0,060		24,95	13243	16	120						
B3	10,026	2,895	0,060		24,93	14427	17	123						
C1	10,048	2,503	0,060		24,93	11340	14	84	6,82	90	2,27	25,26		
C2	10,043	2,618	0,060		24,92	12361	15	96						
C3	10,054	2,496	0,060		25,92	12026	14	89						
D1	10,032	2,547	0,060		24,96	12210	15	92	4,96	97	0,28	24,92		
D2	10,092	2,609	0,060		24,96	13225	16	102						
D3	10,090	2,570	0,060		24,84	12950	15	98						
E1	10,038	2,585	0,060		24,86	13226	16	101	4,29	103	0,08	24,84		
E2	10,003	2,558	0,060		24,82	13180	16	100						
E3	10,039	2,564	0,060		24,83	14337	17	108						

## Mangiferina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 6 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente Intersección	855,90 -253,80	W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,023	2,422	0,060	1,5	24,84	8879	11	64	13,42	76	0,05	24,85
A1	10,020	2,380	0,060		24,86	11220	13	80				
A3	10,080	2,434	0,060		24,86	11616	14	83				
B1	10,069	2,402	0,060		24,86	9164	11	66	11,52	75	0,02	24,86
B2	10,011	2,674	0,060		24,85	10348	12	82				
B3	10,027	2,655	0,060		24,86	9851	12	78				
C1	10,008	2,646	0,060		24,84	11580	14	91	10,78	95	0,02	24,84
C2	10,082	2,598	0,060		24,84	13876	17	106				
C3	10,082	2,640	0,060		24,83	11145	13	87				
D1	10,010	2,042	0,060		24,86	12598	15	76	16,28	66	6,78	25,87
D2	10,010	2,266	0,060		24,86	9917	12	67				
D3	10,020	2,343	0,060		27,90	7787	9	55				
E1	10,043	2,327	0,060		27,87	11018	13	76	2,14	75	0,07	27,85
E2	10,050	2,300	0,060		27,83	10696	13	73				
E3	10,005	2,358	0,060		27,84	10591	13	75				

## Mangiferina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 24 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente		855,22		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección		-253,80												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,049	2,582	0,060	1,5	27,85	7879	10	61	11,18	70	6,29	25,96		
A1	10,054	2,664	0,060		25,02	9158	11	73						
A3	10,008	2,360	0,060		25,02	10793	13	76						
B1	10,013	2,562	0,060		25,00	13543	16	103	15,22	98	0,02	25,01		
B2	10,077	2,524	0,060		25,01	10816	13	81						
B3	10,096	2,567	0,060		25,01	14547	17	109						
C1	10,059	2,439	0,060		25,00	10930	13	79	14,36	92	0,06	24,98		
C2	10,010	2,440	0,060		24,98	12733	15	92						
C3	10,018	2,547	0,060		24,97	13979	17	106						
D1	10,086	2,510	0,060		24,99	14240	17	105	7,31	98	0,12	24,97		
D2	10,020	2,726	0,060		24,94	11296	14	91						
D3	10,021	2,820	0,060		24,99	11426	14	96						
E1	10,006	2,534	0,060		25,01	10759	13	81	17,03	99	0,04	25,00		
E2	10,001	2,791	0,060		25,00	13895	17	115						
E3	10,020	2,592	0,060		24,99	13136	16	101						

## Mangiferina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 3 horas

Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente 855,22		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección -253,80												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,068	2,846	0,060	1,5	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
A1	10,015	2,920	0,060		NP	NP	NP	NP				
A3	10,015	2,735	0,060		NP	NP	NP	NP				
B1	10,075	2,584	0,060		24,87	333	1	4	6,42	5	0,08	24,85
B2	10,036	2,565	0,060		24,85	343	1	4				
B3	10,007	2,764	0,060		24,83	356	1	14				
C1	10,048	2,532	0,060		24,81	1712	2	11	13,03	13	0,06	24,80
C2	10,043	2,589	0,060		24,80	1221	2	13				
C3	10,054	2,664	0,060		24,78	1432	2	13				
D1	10,038	2,819	0,060		24,82	2731	3	24	4,49	24	0,04	24,83
D2	10,003	2,803	0,060		24,83	2742	4	25				
D3	10,039	2,812	0,060		24,84	2509	3	23				
E1	10,038	2,687	0,060		24,90	2741	4	23	5,74	25	0,06	24,90
E2	10,003	2,857	0,060		24,92	2844	4	26				
E3	10,039	2,812	0,060		24,89	2908	4	26				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Mangiferina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 6 horas

Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente 855,22		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección -253,80												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,029	2,535	0,060	1,5	24,56	4562	6	36	28,62	27	0,15	24,59
A1	10,020	2,446	0,060		24,58	3263	4	25				
A3	10,080	2,594	0,060		24,63	2471	3	21				
B1	10,069	3,225	0,060		24,65	128	0	4	3,60	4	0,15	24,63
B2	10,011	3,320	0,061		24,66	122	0	4				
B3	10,027	2,975	0,060		24,59	135	0	3				
C1	10,008	3,168	0,060		24,64	752	1	9	15,49	8	0,05	24,63
C2	10,082	2,780	0,060		24,62	822	1	9				
C3	10,082	2,588	0,061		24,62	666	1	7				
D1	10,010	2,202	0,061		24,75	2484	3	17	21,33	22	2,19	24,98
D2	10,010	2,643	0,060		25,60	3228	4	27				
D3	10,020	2,242	0,060		24,58	3145	4	22				
E1	10,043	2,443	0,060		24,69	6965	8	51	27,63	74	0,27	24,70
E2	10,050	2,435	0,060		24,77	12627	15	91				
E3	10,005	2,425	0,060		24,64	11200	13	81				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Mangiferina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 24 horas

Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente		855,22		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección		-253,80												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,049	2,012	0,060	1,5	24,93	3503	4	22	18,37	20	0,55	24,77		
A1	10,054	2,098	0,060		24,71	3262	4	21						
A3	10,008	2,038	0,060		24,68	2361	3	15						
B1	10,013	2,581	0,065		24,67	1257	2	10	9,52	11	0,05	24,68		
B2	10,054	2,523	0,060		24,67	1325	2	12						
B3	10,096	2,550	0,060		24,69	1037	2	10						
C1	10,059	2,263	0,060		24,67	2166	3	16	18,66	13	0,04	24,68		
C2	10,010	2,614	0,060		24,69	1335	2	12						
C3	10,035	2,564	0,060		24,68	1260	2	11						
D1	10,002	2,241	0,060		24,68	1739	2	13	17,45	16	0,06	24,69		
D2	10,020	2,594	0,064		24,69	2347	3	19						
D3	10,021	2,673	0,060		24,71	1891	3	17						
E1	10,006	2,388	0,060		24,70	2108	3	16	10,39	15	0,06	24,70		
E2	10,001	2,729	0,060		24,69	1568	2	14						
E3	10,010	2,656	0,060		24,72	1468	2	13						

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Mangiferina

Método de extracción: Soxhlet

Tiempo de extracción: 4 horas

Solvente de extracción: Etanol

Pendiente		855,22		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección		-253,80												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	5,007	1,370	0,060	1,5	25,15	9623	12	79	0,00	93	0,27	25,07		
A1	5,008	2,000	0,061		25,04	9741	12	116						
A3	5,005	1,365	0,060		25,03	10448	13	85						
B1	5,006	2,535	0,060		24,75	473	1	11	0,32	10	0,02	24,75		
B2	5,008	1,730	0,060		24,75	922	1	12						
B3	5,002	1,994	0,060		24,74	324	1	7						
C1	1,701	0,534	0,060		24,52	1389	2	15	0,31	13	0,33	24,60		
C2	1,701	0,674	0,060		24,59	1304	2	18						
C3	1,701	0,617	0,060		24,68	400	1	7						
D1	5,001	1,604	0,060		24,79	4821	6	47	0,01	41	0,44	24,67		
D2	5,003	1,573	0,060		24,64	3612	5	35						
D3	5,002	1,325	0,060		24,58	5052	6	41						
E1	1,702	0,968	0,060		24,72	1993	3	37	0,02	36	0,22	24,78		
E2	1,701	0,514	0,060		24,81	2895	4	28						
E3	1,701	0,837	0,060		24,82	2792	4	44						

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Mangiferina

Método de extracción: Soxhlet

Tiempo de extracción: 4 horas

Solvente de extracción: Metanol

Pendiente		855,22		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Promedio TR (min)
Intersección		-253,80												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	5,007	1,359	0,060	1,5	24,82	925	1	9	17,39	8	0,02	24,82		
A1	5,008	1,602	0,060		24,81	514	1	7						
A3	5,005	1,409	0,060		24,82	579	1	7						
B1	5,006	0,472	0,060		24,81	319	1	2	43,15	3	0,18	24,80		
B2	5,008	1,095	0,061		24,75	323	1	4						
B3	5,002	1,195	0,060		24,84	327	1	4						
C1	1,701	0,292	0,060		24,84	390	1	3	19,15	3	0,05	24,83		
C2	1,701	0,200	0,060		24,82	492	1	3						
C3	1,701	0,197	0,060		24,82	862	1	4						
D1	5,001	0,809	0,060		24,81	871	1	5	30,53	5	0,06	24,83		
D2	5,003	1,150	0,060		24,84	259	1	4						
D3	5,002	1,011	0,060		24,83	856	1	7						
E1	1,702	0,079	0,061		24,81	457	1	1	57,82	2	2,38	25,09		
E2	1,701	0,283	0,060		25,78	423	1	3						
E3	1,701	0,163	0,060		24,69	419	1	2						

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Anexo 15. Análisis estadístico de mangiferina.

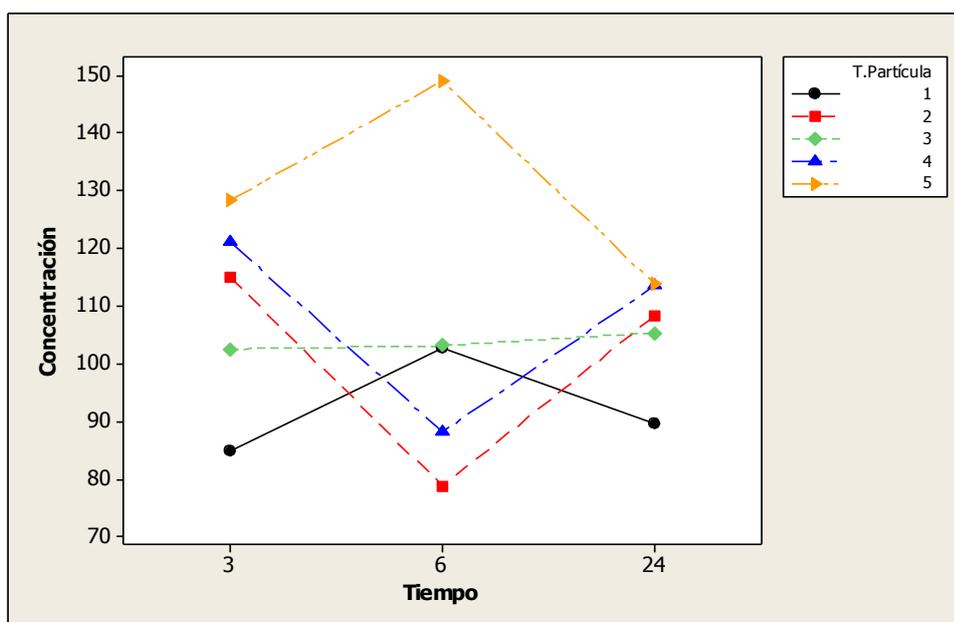
Donde el tamaño de partícula corresponde a:

- 1)  $>500 \mu\text{m}$
- 2)  $>355 \leq 500 \mu\text{m}$
- 3)  $>250 \leq 355 \mu\text{m}$
- 4)  $>125 \leq 250 \mu\text{m}$
- 5)  $<125 \mu\text{m}$

### Método: Maceración dinámica

Solvente de extracción: Sumatoria de etanol + metanol

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		106,687	2,517	42,38	0,000
T.Partícula	31,086	15,543	3,560	4,37	0,000
Tiempo	-2,044	-1,022	2,752	-0,37	0,712
T.Partícula*Tiempo	-9,087	-4,543	3,892	-1,17	0,250



### Método: Soxhlet

Solvente de extracción: Sumatoria de etanol + metanol

One-way ANOVA: Concentración versus T. Partícula

Source	DF	SS	MS	F	P
T.Partícula	4	14332	3583	30,82	0,000
Error	10	1163	116		
Total	14	15495			

**Anexo 16.** Análisis estadístico de mangiferina con respecto al método de extracción.

**Solvente: Sumatoria etanol + metanol**

**One-way ANOVA: Concentración versus Tiempo**

Source	DF	SS	MS	F	P
Tiempo	1	1260	1260	5,39	0,081
Error	4	935	234		
Total	5	2194			

**Anexo 17.** Determinación de quercetina en los subproductos de mango.

## Quercetina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 3 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente	1097,69	W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección	-1007,62											
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	10,068	2,589	0,060	1,5	39,51	6015	6	41	15,11	48	0,09	39,47
A1	10,015	2,595	0,060		39,44	7029	7	47				
A3	10,015	2,564	0,060		39,47	8531	9	55				
B1	10,007	2,541	0,060		39,44	7444	8	49	7,07	53	0,08	39,41
B2	10,036	3,065	0,060		39,40	6732	7	55				
B3	10,026	2,895	0,060		39,38	7537	8	56				
C1	10,048	2,503	0,060		39,40	2049	3	17	4,58	18	0,08	39,39
C2	10,043	2,618	0,060		39,35	2170	3	19				
C3	10,054	2,496	0,060		39,41	2142	3	18				
D1	10,032	2,547	0,060		39,47	6843	7	45	19,26	53	0,86	39,19
D2	10,092	2,609	0,060		39,29	7281	8	49				
D3	10,090	2,570	0,060		38,82	10111	10	64				
E1	10,038	2,585	0,060		38,93	6411	7	44	17,19	51	0,32	38,79
E2	10,003	2,558	0,060		38,70	9453	10	61				
E3	10,039	2,564	0,060		38,74	7479	8	49				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Quercetina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 6 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente		1097,69		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección		-1007,62												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,023	2,422	0,060	1,5	38,84	11968	12	71	6,48	60	0,11	38,89		
A1	10,020	2,380	0,060		38,90	9333	9	78						
A3	10,080	2,434	0,060		38,92	9772	10	69						
B1	10,069	2,402	0,060		38,86	3060	4	22	11,02	29	57,74	38,86		
B2	10,011	2,674	0,060		38,85	3542	4	28						
B3	10,027	2,655	0,060		38,85	3163	4	25						
C1	10,008	2,646	0,060		38,83	5620	6	40	11,84	38	0,04	38,81		
C2	10,082	2,598	0,060		38,81	5630	6	39						
C3	10,082	2,640	0,060		38,80	4359	5	32						
D1	10,010	2,042	0,060		38,84	7518	8	39	9,37	46	15,72	46,15		
D2	10,010	2,266	0,060		46,27	8280	8	48						
D3	10,020	2,343	0,060		53,35	7426	8	45						
E1	10,043	2,327	0,060		53,27	12653	12	54	6,93	58	0,21	53,17		
E2	10,050	2,300	0,060		53,18	10836	11	62						
E3	10,005	2,358	0,060		53,05	11068	11	59						

## Quercetina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 24 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente		1097,69		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección		-1007,62												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,049	2,582	0,060	1,5	42,98	4641	5	33	7,39	30	4,55	40,83		
A1	10,054	2,664	0,060		39,77	3792	4	29						
A3	10,008	2,360	0,060		39,75	4496	5	29						
B1	10,013	2,562	0,060		39,70	11049	11	70	36,17	51	0,05	39,68		
B2	10,077	2,524	0,060		39,69	4927	5	34						
B3	10,096	2,567	0,060		39,66	7286	8	48						
C1	10,059	2,439	0,060		39,62	4170	5	29	34,74	40	0,05	39,60		
C2	10,010	2,440	0,060		39,58	5666	6	37						
C3	10,018	2,547	0,060		39,60	8677	9	56						
D1	10,086	2,510	0,060		39,66	7374	8	47	15,15	41	0,06	39,65		
D2	10,020	2,726	0,060		39,62	5612	6	41						
D3	10,021	2,820	0,060		39,66	4472	5	35						
E1	10,006	2,534	0,060		39,68	5368	6	37	12,48	42	57,74	39,69		
E2	10,001	2,791	0,060		39,69	5814	6	43						
E3	10,020	2,592	0,060		39,69	7028	7	47						

## Quercetina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 3 horas

Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente		1097,69		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección		-1007,62												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,068	2,846	0,060	1,5	39,97	101	1	7	5,10	7	0,09	39,96		
A1	10,015	2,920	0,060		39,92	106	1	7						
A3	10,015	2,735	0,060		39,99	68	1	7						
B1	10,075	2,584	0,060		40,12	356	1	7	6,87	9	0,17	40,05		
B2	10,036	2,565	0,060		40,05	273	1	7						
B3	10,007	2,764	0,060		39,98	321	1	8						
C1	10,048	2,532	0,060		39,99	155	1	7	2,93	7	0,09	39,95		
C2	10,043	2,589	0,060		39,92	182	1	7						
C3	10,054	2,664	0,060		39,93	157	1	7						
D1	10,038	2,819	0,060		40,07	195	1	8	1,35	8	0,04	40,09		
D2	10,003	2,803	0,060		40,10	206	1	8						
D3	10,039	2,812	0,060		40,09	224	1	8						
E1	10,038	2,687	0,060		39,77	303	1	8	0,63	8	0,04	39,77		
E2	10,003	2,857	0,060		39,79	236	1	8						
E3	10,039	2,812	0,060		39,76	242	1	8						

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Quercetina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 6 horas

Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente		1097,69		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección		-1007,62												
EXTRACTO	Wo (g)													
A1	10,029	2,535	0,060	1,5	38,01	392	1	8	3,10	8	0,39	38,14		
A1	10,020	2,446	0,060		38,10	393	1	8						
A3	10,080	2,594	0,060		38,30	400	1	8						
B1	10,069	3,225	0,060		38,35	22	1	8	5,40	7	0,16	38,29		
B2	10,011	3,320	0,061		38,29	27	1	8						
B3	10,027	2,975	0,060		38,23	21	1	7						
C1	10,008	3,168	0,060		39,11	335	1	10	10,90	9	0,05	39,10		
C2	10,082	2,780	0,060		39,12	285	1	9						
C3	10,082	2,588	0,061		39,08	333	1	8						
D1	10,010	2,202	0,061		38,75	487	1	7	11,21	8	0,94	38,33		
D2	10,010	2,643	0,060		38,15	459	1	9						
D3	10,020	2,242	0,060		38,10	415	1	7						
E1	10,043	2,443	0,060		38,92	235	1	7	3,60	7	1,03	38,73		
E2	10,050	2,435	0,060		39,00	173	1	6						
E3	10,005	2,425	0,060		38,27	164	1	6						

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Quercetina

Método de extracción: Maceración Dinámica

Tiempo de extracción: 24 horas  
Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente		1097,69	W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección		-1007,62											
EXTRACTO	W <sub>0</sub> (g)												
A1	10,049	2,012	0,060	1,5	39,18	224	1	6	6,79	6	1,07	38,71	
A1	10,054	2,098	0,060		38,53	343	1	6					
A3	10,008	2,038	0,060		38,41	282	1	6					
B1	10,013	2,581	0,065		38,35	246	1	7	6,69	7	0,12	38,40	
B2	10,054	2,523	0,060		38,4	226	1	7					
B3	10,096	2,550	0,060		38,44	329	1	8					
C1	10,059	2,263	0,060		38,41	267	1	7	7,91	7	0,04	38,39	
C2	10,010	2,614	0,060		38,39	272	1	8					
C3	10,035	2,564	0,060		38,38	261	1	7					
D1	10,002	2,241	0,060		38,41	227	1	6	12,38	7	0,12	38,41	
D2	10,020	2,594	0,064		38,37	187	1	7					
D3	10,021	2,673	0,060		38,46	301	1	8					
E1	10,006	2,388	0,060		38,45	226	1	7	6,71	7	0,39	38,52	
E2	10,001	2,729	0,060		38,41	218	1	8					
E3	10,010	2,656	0,060		38,69	210	1	7					

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Quercetina

Método de extracción: Soxhlet

Tiempo de extracción: 4 horas

Solvente de Extracción: Etanol

Pendiente 1097,69		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección -1007,62												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	5,007	1,370	0,060	1,5	40,20	9667	10	67	24,05	77	0,49	39,98
A1	5,008	2,000	0,061		39,91	8675	6	87				
A3	5,005	1,365	0,060		39,83	7769	6	54				
B1	5,006	2,535	0,060		35,61	2562	3	41°	24,23	34	0,03	35,62
B2	5,008	1,730	0,060		35,61	2315	3	26				
B3	5,002	1,994	0,060		35,63	2259	3	30				
C1	1,701	0,534	0,060		35,72	656	2	12	12,35	14	1,08	36,10
C2	1,701	0,674	0,060		36,09	677	2	15				
C3	1,701	0,617	0,060		36,50	622	1	13				
D1	5,001	1,604	0,060		37,02	2883	4	28	21,73	30	1,32	37,51
D2	5,003	1,573	0,060		37,49	3449	4	32				
D3	5,002	1,325	0,060		38,01	2395	3	20				
E1	1,702	0,968	0,060		38,62	2467	3	45	24,17	36	0,51	38,85
E2	1,701	0,514	0,060		38,95	2987	4	27				
E3	1,701	0,837	0,060		38,97	2278	3	37				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

## Quercetina

Método de extracción: Soxhlet

Tiempo de extracción: 4 horas  
Solvente de Extracción: Metanol

Pendiente 1097,69		W ext (g)	W ext a (g)	Vol. (mL)	TR (min)	Área	Conc. (ppm)	Conc. F (mg/kg)	% C.V Conc. (mg/kg)	Prom. Conc. (mg/kg)	% C.V TR (min)	Prom. TR (min)
Intersección -1007,62												
EXTRACTO	Wo (g)											
A1	5,007	1,359	0,060	1,5	38,92	310	1	8	9,95	8	0,07	38,94
A1	5,008	1,602	0,060		38,93	294	1	9				
A3	5,005	1,409	0,060		38,97	233	1	8				
B1	5,006	0,472	0,060		39,00	121	1	2	42,84	5	0,08	39,03
B2	5,008	1,095	0,061		39,02	129	1	6				
B3	5,002	1,195	0,060		39,06	124	1	6				
C1	1,701	0,292	0,060		35,32	228	1	5	22,47	4	0,16	35,27
C2	1,701	0,200	0,060		35,29	288	1	3				
C3	1,701	0,197	0,060		35,21	221	1	3				
D1	5,001	0,809	0,060		38,93	184	1	4	15,43	5	0,05	38,95
D2	5,003	1,150	0,060		38,97	130	1	6				
D3	5,002	1,011	0,060		38,94	105	1	5				
E1	1,702	0,079	0,061		38,66	374	1	1	54,07	3	2,13	38,88
E2	1,701	0,283	0,060		38,18	183	1	5				
E3	1,701	0,163	0,060		39,79	207	1	3				

\*La parte sombreada representa a un área que está fuera del rango lineal.

**Anexo 18.** Análisis estadístico de quercetina.

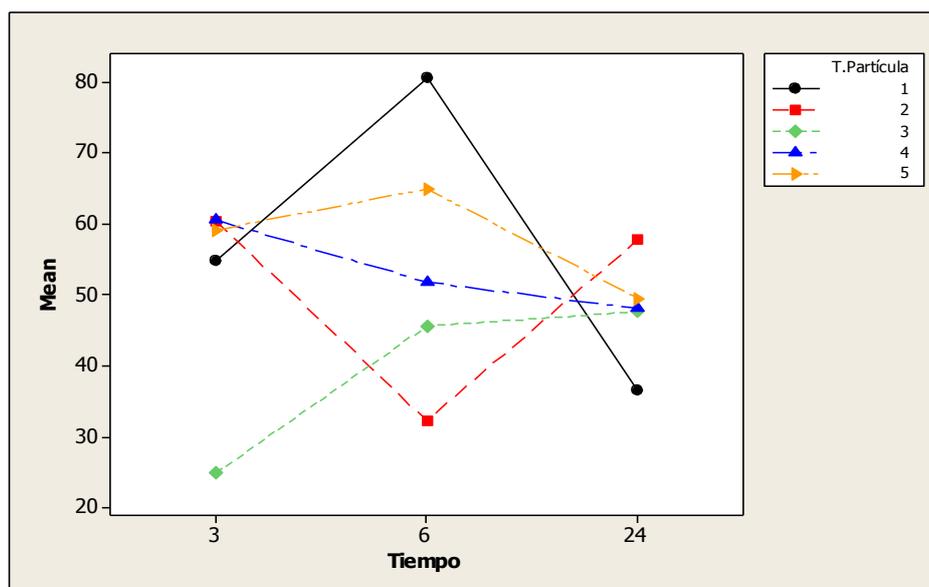
Donde el tamaño de partícula corresponde a:

- 1) >500  $\mu\text{m}$
- 2) >355  $\leq$  500  $\mu\text{m}$
- 3) >250  $\leq$  355  $\mu\text{m}$
- 4) >125  $\leq$  250  $\mu\text{m}$
- 5) <125  $\mu\text{m}$

**Método: Maceración dinámica**

Solvente de extracción: Sumatoria de etanol + metanol

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		50,961	2,360	21,59	0,000
T.Partícula	2,551	1,276	3,338	0,38	0,704
Tiempo	-5,572	-2,786	2,580	-1,08	0,287
T.Partícula*Tiempo	3,338	1,669	3,649	0,46	0,650



**Método: Soxhlet**

Solvente de extracción: Sumatoria de etanol + metanol

**One-way ANOVA: Concentración versus T.Partícula**

Source	DF	SS	MS	F	P
T.Partícula	4	3321,0	830,2	15,10	0,000
Error	10	549,7	55,0		
Total	14	3870,7			

**Anexo 19.** Análisis estadístico de quercetina con respecto al método de extracción.

**Solvente: Sumatoria de etanol + metanol**

One-way ANOVA: Concentración versus Tiempo

Source	DF	SS	MS	F	P
Tiempo	1	454,5	454,5	5,42	0,080
Error	4	335,6	83,9		
Total	5	790,1			