

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/38
I.S.B.N.: 978-84-15939-10-8

EVA DORTA PÉREZ

**Obtención de extractos con elevada actividad
antioxidante y/o antimicrobiana
a partir de piel y semilla de mango**

Directoras
MÓNICA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
MARÍA GLORIA LOBO RODRIGO



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Cuando empecé mi andadura en el mundo de la investigación nunca imaginé que esta experiencia me brindara la oportunidad de crecer no sólo profesionalmente sino personalmente. Evidentemente el desarrollo de esta Tesis Doctoral nunca hubiese sido posible sin el apoyo de todas aquellas personas que me han acompañado en este camino, a los que deseo expresar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, agradecer a mis padres por el apoyo y la comprensión que siempre he encontrado en ellos, dándome fuerzas y ánimos para seguir hacia delante, gracias por ser un ejemplo de esfuerzo y superación.

A toda mi familia, a mi hermano, Edgar, por escuchar todas mis charlas “filosóficas” y soportar los malos momentos, gracias por ser como eres, no cambies mi “enano”. A Jorge, por acompañarme en este camino largo y difícil, por intentar hacerme ver la vida de otra manera, y ayudarme a saber cómo afrontar cada reto, gracias por estar a mí lado. A mis tíos y tías, gracias tía Lucy y tito “Yoyo”, quienes han aportado su cariño y comprensión con palabras de aliento cuando más lo necesitaba. A mi tía María, por estar presente cada minuto de mi día a día, por protegerme y porque en un día como hoy, sólo tú presencia haría que mi vida fuera completa, porque sé que te sentirías muy orgullosa de mi, espero que donde estés puedas verme, esto va dedicado a ti, TE QUIERO.

A mi Dory que soportó valientemente y con paciencia cada mañana, cada tarde y cada noche, siempre dispuesta a darme compañía, apoyo y cariño, TE ADORO mi “princesita”.

A mis amigas, todas ellas mujeres excepcionales, que han estado a mi lado todo este tiempo, no sé qué haría sin esos momentos en los que al estar a vuestro lado consigo ver la vida con otro prisma.

Gracias a mis directoras de Tesis, las Dras. Gloria Lobo y Mónica González, por la confianza, orientación y consejos durante esta etapa de mi vida, sabiendo que siempre podré contar con ustedes. A la Dra. Gloria, gracias por tu cariño, atención y tus palabras de ánimo. A la Dra. Mónica, por todos estos años en los que hemos superado todas las barreras, que no han sido pocas, consiguiendo que esta Tesis Doctoral saliera

adelante. Gracias por enseñarme el “arte” de hacer Ciencia, por transmitirme todos tus conocimientos y hacerme crecer.

A los compañeros del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), quienes poco a poco se han convertido en grandes amigos que se han ganado mi corazón de por vida.

A Federico Laich y Javier Ledesma del Dpto. de Microbiología Aplicada del ICIA, quienes me recibieron con las manos abiertas en su laboratorio, y me mostraron siempre un gran cariño y ayuda. Gracias Federico por hacer posible la parte más biológica de esta Tesis, gracias por contagiarme con tu sabiduría profesional y personal, gracias por tus largas charlas tan enriquecedoras. Te echaré de menos.

Gracias al Dpto. Informática y Medios Audiovisuales, donde conocí al “grandote” de Fran, al “loco” de Fermín, y al “jefe” José Ignacio, que siempre me ayudaron en todo, qué haría yo sin sus aportaciones artísticas y tecnológicas. Gracias Fran por estar presente cada minuto aportando un reflejo de luz cuando más lo necesitaba. A José Ignacio, gracias por acompañarme siempre, preocuparte, ayudarme entodo y sobretodo darme un enorme cariño, te estaré eternamente agradecida. GRACIAS CHICOS, los llevaré siempre en mi corazón.

Gracias a mis “compis” de laboratorio, Yurena y Rafa, que me escuchaban atentamente todas mis anécdotas. A Rafa, gracias por estar mi lado en mis primeros pasos en el laboratorio y por acompañarme todo este tiempo siendo un apoyo incondicional.

Al Director Científico del ICIA, Manuel Caballero que siempre tuvo total disposición a ayudarme y apoyarme en todas las propuestas, gracias por escucharme y darme esta oportunidad.

Al Dpto. de Fruticultura Tropical por todas las facilidades que me brindaron siempre, en especial a M^a José Grajal y a Juan Cabrera. A Carlos porque siempre se preocupó de que estuviera bien.

Gracias a Hilario y a Marcos que me sacaban una sonrisa y estaban pendientes de mi cuando me daban “las mil y una noches” en los laboratorios, se convirtieron en mis protectores. Gracias a Carmen por esas tardes de charlas.

A las Dras. Begoña de Ancos y Concepción Sánchez-Moreno por acogerme en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), y darme la oportunidad de poder avanzar en el mundo de la investigación. Gracias Begoña por tu trato cercano y tu ayuda incondicional. A Clara y Diana, compañeras de laboratorio con las que tuve el placer de trabajar en Madrid, gracias por hacerme sentir como en casa.

Gracias al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria por la concesión de la beca predoctoral y las ayudas necesarias para el desarrollo de esta Tesis.

“Vivir no es sólo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar. Descansar, es empezar a morir” (Gregorio Marañón).

A mis padres

A mi hermano

A mi Dory

ÍNDICE

Introducción General	15
1. Valorización de los biorresiduos	18
2. Compuestos bioactivos presentes en biorresiduos vegetales	22
3. Compuestos bioactivos presentes mango	25
4. Obtención de compuestos bioactivos a partir de biorresiduos	28
4.1. Origen y estado de madurez de la fruta a partir de la que se obtiene el biorresiduo	28
4.2. Estabilización de la muestra	30
4.3. El proceso de extracción	32
4.3.1. Disolvente de extracción	33
4.3.2. Temperatura de extracción	39
4.3.3. Tiempo de extracción	40
4.3.4. Número de ciclos de extracción	41
4.3.5. Relación volumen de disolvente y peso de material vegetal	42
4.3.6. Técnica de extracción	43
Justificación Temática	49
Bibliografía	58
Objetivos	74
Material y Métodos	78
1. Material Vegetal	78
2. Maduración de la fruta y caracterización de la misma	79
3. Obtención y estabilización del material vegetal: piel y semilla de mango	81
4. Obtención de extractos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana	82
5. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos	84
5.1. Determinación de la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica	84
5.1.1. Ensayo del blanqueamiento del β -caroteno	84
5.1.2. Ensayo de las sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)	85
5.2. Determinación de la capacidad del extracto para atrapar radicales libres	86
5.2.1. Test del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH [•])	86
5.2.2. Test del 2,2-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)(ABTS ^{•+})	86

6. Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los extractos	87
6.1. Ensayo de difusión en agar	89
6.2. Ensayo de micro-dilución	89
7. Rendimiento de la extracción	90
8. Cuantificación de compuestos bioactivos	91
8.1. Fenoles totales	91
8.2. Taninos	91
8.3. Proantocianidinas o taninos condensados	92
8.4. Flavonoides totales	92
8.5. Antocianos totales	93
8.6. Clorofilas	94
9. Identificación de compuestos bioactivos	94
10. Análisis de datos	96
Bibliografía	101
Resultados y Discusión	104
1. Estabilización del material vegetal	104
2. Elección del disolvente y temperatura de extracción	112
3. Optimización de los factores que afectan a la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la semilla de mango	123
3.1. Contenido de agua en la mezcla del disolvente de extracción	124
3.2. Relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente	127
3.3. Número de pasos del proceso de extracción	128
3.4. Tiempo de extracción	131
3.5. pH del agua en el extractante	132
3.6. Condiciones óptimas de extracción para maximizar la actividad antioxidante de los extractos de semilla de mango.	132
4. Optimización de los factores que afectan a la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la piel de mango	134
4.1. Factores que afectan a la capacidad de los extractos de piel de mango de atrapar radicales libres	135
4.2. Factores que afectan a la capacidad de los extractos de piel de mango para inhibir la peroxidación lipídica	138
4.3. Factores que afectan al contenido en compuestos bioactivos de los extractos de piel de mango	138

4.4. Condiciones óptimas de extracción para maximizar la actividad antioxidante de los extractos de piel de mango	139
5. Actividad antioxidante, antimicrobiana y contenido en fenoles de los extractos de tres variedades de mango	142
5.1. Contenido en compuestos bioactivos	142
5.2. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las tres variedades	144
5.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de la tres variedades de mango	147
6. Identificación de compuestos bioactivos presentes en extractos de piel y semilla de mango obtenidos en condiciones óptima	150
7. Relación entre la actividad antioxidante, antifúngica y perfil polifénolico de los extractos de piel y semilla de mango	155
Bibliografía	161
Conclusiones	170
Publicaciones y Artículos	174
I. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity	176
II. Reutilization of mango by-products: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties	185
III. Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from mango seed	194
IV. Improving the efficiency of antioxidant extraction from mango peel by using microwave-assisted extraction	210
V. La actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de piel y semilla obtenidos a partir de tres variedades de mango	221
VI. La identificación de los compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de piel y semilla de tres variedades de mango	253

Introducción General

Introducción General

El mango (*Mangifera indica* L.) pertenece a la familia Anacardiaceae, compuesta por unas 430 especies de las que algunos géneros son de importancia comercial, como el anacardo (*Anacardium occidentale* L.) y el pistacho (*Pistacia vera* L.). El género *Mangifera* comprende 69 especie y tiene su origen en la región indo-birmánica desde donde se extendió a más de 100 países de los trópicos y subtrópicos debido, sin duda, a la conjunción de dos importantes factores: la excelencia del fruto y la labor de agricultores e investigadores en la mejora del cultivo (Galán-Saúco, 2009). Así, dentro de la familia de las Anacardiáceas, el mango es, indudablemente, la especie de mayor importancia.

El fruto del mango (Figura 1) es una drupa que se presenta en solitario o en racimos según las distintas variedades y que varía en peso, desde 0,2 hasta 2 kg y en forma, desde redondeada hasta ovoide, arriñonada y a veces aplanada lateralmente (Galán-Saúco, 2009).



Figura 1. Fotografía del fruto de tres variedades de mango, de izquierda a derecha: “Keitt”, “Gomera 3”, “Sensation”

Exteriormente, el fruto está constituido por la piel o exocarpo, una parte comestible o mesocarpo y un hueso cartilaginoso o endocarpo que encierra la semilla. El color de la piel varía dependiendo de la variedad, pudiendo ser verde, amarillo, rosa, rojo, púrpura o una combinación de éstos. La semilla única puede contener uno o más embriones (mono- y poliembriónicas), es ovoide, oblonga,

alargada y se encuentra recubierta por un endocarpo fibroso. Posee una testa delgada y de consistencia como el papel (Galán-Saúco, 2009).

El mango es una de las frutas tropicales más importantes en términos de producción e importancia a nivel mundial, ocupando actualmente el segundo lugar en la producción mundial de frutas tropicales, inmediatamente después del plátano (*Musa acuminata* Colla AAA) (FAO, 2011). La producción mundial de mango (junto con la de mangostán (*Garcinia mangostana* L.) y la de guayaba (*Psidium guajava* L.) fue de 38,9 millones de toneladas en el año 2011 (FAO, 2011), siendo los principales países productores India, China y Tailandia (Figura 2). Desde el año 2005 hasta el año 2011 la producción de mango se ha incrementado un 20%, lo que da una idea del aumento de la popularidad de este fruto tropical. Por otra parte, la extensión en el cultivo del mango desde los trópicos hasta los subtrópicos, desde los 36° de latitud Norte de España hasta los 33° de latitud Sur en Sudáfrica (Galán-Saúco, 2009), ha posibilitado el desarrollo de numerosas variedades así como la posibilidad de suministrar mango a los mercados durante prácticamente todo el año.

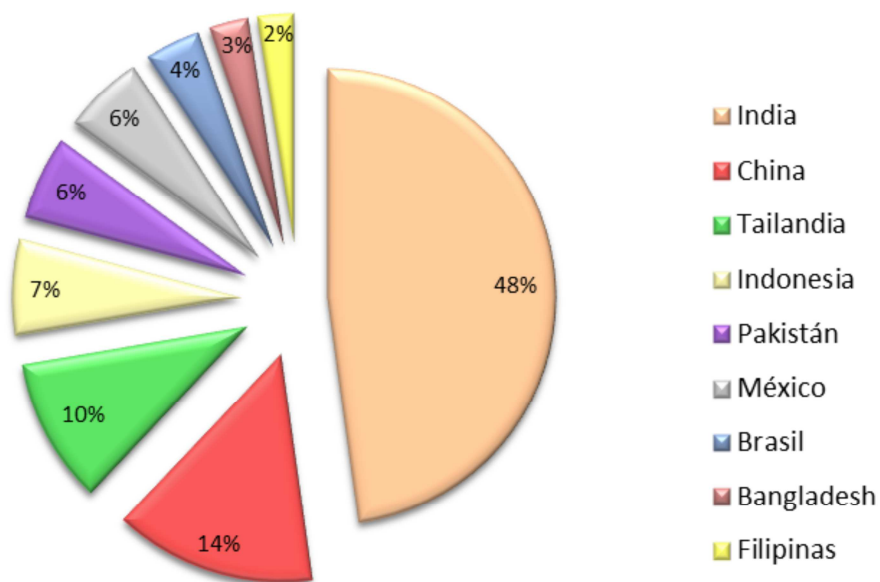


Figura 2. Principales países productores de mango (*Mangifera indica* L.) (Fuente: FAO, 2011)

Además de la extensión del cultivo del mango, su gran antigüedad como cultivo y la naturaleza de su reproducción sexual han permitido el desarrollo de un gran número de variedades cultivadas o cultivares de mango (Galán-Saúco, 2009).

Las variedades “Tommy Atkins”, “Haden”, “Kent”, “Keitt” e “Irwin” son las más exportadas a la Unión Europea (UE) y a Norteamérica, donde preferentemente se consumen mangos coloreados y con las características gustativas propias de los mismos, que podrían definirse como de una equilibrada relación azúcar/acidez (Galán-Saúco, 2009).

En el año 2010, la producción de mango en Canarias fue de 8.115 toneladas con una valoración de 17.290 miles de euros (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias, 2010). A pesar de que la producción de mango es inferior a la de otras frutas como la naranja (*Citrus sinensis* L.) (14.783 toneladas) o la papaya (*Carica papaya* L.) (13.969 toneladas) los beneficios económicos de estas frutas (10.113 y 4.478 miles de euros, respectivamente) son inferiores, por lo que el mango supone importantes beneficios para la economía canaria. En la Península Ibérica, la principal producción de mango se encuentra en Andalucía. En 2012, el cultivo del mango, junto con el del olivar (*Olea europaea* L.), fue el más importante, produciéndose en el caso del mango 16.000 toneladas (ASAJA, 2012).

Actualmente la producción mundial de mango está destinada fundamentalmente al mercado de fruta fresca. Sin embargo, la producción de derivados como jugos, néctares, concentrados, mermeladas, gelatinas, cereales, fruta deshidratada, etc., va en aumento debido al incremento en el consumo de este tipo de productos en Europa. En consecuencia, se generan cantidades importantes de material vegetal de desecho o biorresiduos, que en el caso del mango consisten en la piel y en la semilla. Dependiendo de la variedad y del proceso industrial al que sea sometida la fruta, estos biorresiduos representan alrededor del 35-60% del peso total del fruto (Larrauri & Cerezal, 1993). Estos biorresiduos constituyen un problema desde el punto de vista medioambiental, por lo que existe un alto interés en su tratamiento así como en su minimización (Galanakis, 2012).

1. Valorización de los biorresiduos

Las medidas de valorización de los biorresiduos tienen una gran importancia desde el punto de vista medioambiental, y en este sentido la Directiva Comunitaria 1999/31/CE del 26 de abril de 1999 (Consejo de la Unión Europea, 1999) determina que debe reducirse la cantidad de residuos, especialmente los que están destinados a los vertederos, estableciendo la necesidad de disminuir la cantidad de desechos orgánicos biodegradables en los vertederos en un 65% para Julio de 2016, con respecto a la cantidad existente en 1995. En 2005, la Comisión Europea realiza un informe en el que expone que, tras analizar las estrategias de los Estados Miembros, no está claro que se alcancen los objetivos de reducción de vertidos por parte de los mismos, por lo que es necesario invertir esfuerzos suplementarios para lograr los objetivos propuestos en la Directiva Comunitaria 1999/31/CE (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005). El 19 de noviembre de 2008, la Directiva Comunitaria 2008/98/CE (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2008) establece que los Estados Miembros han de adoptar medidas para impulsar el tratamiento de biorresiduos¹, de tal manera que se logre un alto grado de protección del medio ambiente y que además los materiales que se produzcan a partir de éstos biorresiduos sean ambientalmente seguros. Por otra parte, se señala que los Estados Miembros han de adoptar las medidas necesarias para garantizar que todos los residuos se sometan a operaciones de valorización² y reciclado³.

Actualmente el desarrollo tecnológico de los últimos años hace que sea mucho más fácil la recuperación, el reciclaje y la sostenibilidad de los residuos orgánicos (Galanakis, 2012). Entre las principales formas de aprovechamiento de los biorresiduos se pueden citar la producción de compostaje, de energía (digestión anaerobia, gasificación, obtención de etanol), la utilización en alimentación animal

¹ residuo biodegradable de jardines y parques, residuos alimenticios y de cocina procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de consumo al por menor, y residuos comparables procedentes de plantas transformadoras de alimentos.

² cualquier operación cuyo resultado principal sea que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular, o que el residuo sea preparado para cumplir esa función, en la instalación o en la economía en general.

³ toda operación de valorización mediante la cual los materiales de residuos son transformados de nuevo en productos, materiales, o sustancias, tanto si es con la finalidad original como con cualquier otra finalidad.

o como fertilizantes (Lima et al., 2011; Oishi et al., 2011; Iacovidou et al., 2012). Algunos residuos también podrían ser útiles para su uso en la industria agroalimentaria como fuente de pulpa seca, fibra, aceites esenciales, pectinas, oligosacáridos y grasas (Larrauri et al., 1996; Larrauri et al., 1997; Solís-Fuentes & Durán-de-Bazúa, 2004; Sogi et al., 2005; Ajila et al., 2013).

Una alternativa que ha surgido más recientemente es la reutilización de biorresiduos para la obtención de extractos con alto valor añadido, como es el caso de aquellos con elevada actividad antioxidante. Dichos biorresiduos contienen sustancias con capacidad antioxidante, la presencia en frutas y hortalizas de este tipo de compuestos supone una ventaja desde el punto de vista de la salud, demostrándose en estudios epidemiológicos que una dieta rica en estos alimentos de origen vegetal supone un menor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Wootton-Beard & Ryan, 2011; Reiss et al., 2012). Muchos de los residuos obtenidos a partir de frutas y hortalizas poseen las mismas características que los productos vegetales de partida; es decir, los materiales de desecho obtenidos a partir del procesado de frutas y hortalizas presentan compuestos con actividad antioxidante e incluso, muchas veces, presentan mayor capacidad antioxidante que las partes comestibles (Kim et al., 2010; O'Shea et al., 2012). Así, las semillas de mango, aguacate (*Persea americana* Mill.), tamarindo (*Tamarindus indica* L.) y longan (*Dimocarpus longan* Lour.) presentan mayor capacidad antioxidante y contenido en fenoles que las partes comestibles de dichas frutas (Soong & Barlow, 2004). En el caso del mango, Kim et al. (2010) determinaron que el contenido en fenoles y flavonoides totales de la piel fue entre 2-6 veces superior al de la pulpa (Tabla 1).

En la Tabla 2 se puede observar, para distintas frutas tropicales [aguacate, plátano, guayaba, granada (*Punica granatum* L.) y mango], la variabilidad en cuanto al contenido en fenoles de las diferentes partes de un mismo fruto. A modo de ejemplo, se podría citar los estudios realizados con la piel, la semilla y la pulpa de tres frutos cuyo origen está en el norte de Sudamérica [jagua (*Genipa americana* L.), umbú (*Spondia tuberosa* A.) y jocote (*Spondia purpurea* L.)], para los que los extractos etanólicos de la piel y la semilla presentaron mayor capacidad

antioxidante que los extractos etanólicos de la pulpa (Omena et al., 2012). Estudios recientes sobre la piel de la granada demuestran que es una buena fuente de polifenoles además de poseer una gran capacidad para atrapar radicales libres (Ashoush et al., 2013).

Tabla 1. Contenido en compuestos fenólicos en extractos de piel y de pulpa de mango en distintos estados de madurez (Fuente: Kim et al., 2010)

Material vegetal	Fenoles Totales (mg GAE*/g)	Flavonoides Totales (mg RE*/g)
Pulpa de mango inmaduro	28,8 ± 2,2	8,15 ± 1,54
Piel de mango inmaduro	92,6 ± 3,4	22,2 ± 3,3
Pulpa de mango maduro	26,9 ± 3,8	3,30 ± 0,79
Piel de mango maduro	70,1 ± 4,6	21,2 ± 2,5

Todos los datos están expresados en Materia Seca (MS); *GAE, equivalentes de ácido gálico; RE, equivalente de rutin

Además de las propiedades antioxidantes mostradas por los extractos ricos en compuestos fenólicos, numerosos estudios avalan la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos que provienen de materiales de origen vegetal. Así, extractos fenólicos obtenidos a partir de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), coco (*Cocos nucifera* L.), aceite de oliva, arándanos (*Vaccinium myrtillus* L.), cebollas (*Allium cepa* L.), mango, subproductos de plantas y de la agricultura, residuos de uva (*Vitis vinifera* L.), residuos de la elaboración de la aceite de oliva, de la cerveza, etc., han demostrado tener capacidad antimicrobiana frente a numerosos microorganismos (García-Ruiz et al., 2012). Por otra parte, el estudio de estos extractos en alimentos, por ejemplo en ensaladas de verduras, productos cárnicos como hamburguesas, albóndigas y productos de pollo, ha demostrado el potencial de aplicación de extractos fenólicos como agentes antimicrobianos y antioxidantes capaces de prolongar la vida útil de los productos finales (García-Ruiz et al., 2012).

Tabla 2. Contenido en fenoles totales en diferentes frutos tropicales (Fuente: Ayala-Zavala et al., 2011)

Fruta	Biorresiduo	Fenoles (mg/100 g)
Aguacate	Semilla	5.160 **
	Pulpa	490 **
	Piel	1.260 **
Plátano	Pulpa	232 *
	Piel	928 *
Guayaba	Pulpa	160 **
	Piel	5.870 **
Granada	Pulpa	2.440 **
	Piel	24.990 **
Mango	Semilla	11.700 *
	Pulpa	240 *
	Piel	7.000 **

*Datos expresados por 100 g de MS; ** Datos expresados por 100 g de materia fresca

También se ha demostrado que los extractos metanólicos obtenidos a partir de cáscara de granada tienen un potente espectro de acción frente a bacterias gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y gram-negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumonia*) con un intervalo de concentración mínima inhibitoria (MIC) comprendido entre 0,2 y 0,78 mg/ml de extracto (Fawole et al., 2012). Extractos etanólicos de la piel de la bergamota (*Citrus bergamia* Risso & Poit), un subproducto procedente de la industria de transformación de cítricos, fueron también efectivos frente a bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Salmonella enterica*) (Madalari et al., 2007).

Por lo tanto, los numerosos estudios realizados demuestran el gran potencial de aplicación de los extractos fenólicos como agentes antimicrobianos y antioxidantes lo que permite prevenir el desarrollo de enfermedades transmitidas por los alimentos además de favorecer la conservación de los mismos (García-Ruiz et al., 2012). Así, se puede afirmar que una de las posibilidades de reutilización de los biorresiduos más prometedora es su adición como ingredientes en alimentos funcionales o en alimentos fortificados, ya que los residuos aportan, entre otros,

compuestos fitoquímicos que pueden tener efectos beneficiosos para la salud (Fernández-López et al., 2004; Galanakis, 2012).

2. Compuestos bioactivos presentes en biorresiduos vegetales

Se ha descrito que los residuos vegetales son fuentes importantes de compuestos bioactivos pues son ricos en compuestos fenólicos, carotenoides, fitoesteroles, tocoferoles y ácido ascórbico, compuestos que presentan actividad antioxidante y/o antimicrobiana (González & González, 2010; Ayala-Zavala et al., 2011).

Como se comentó en el apartado anterior, existen multitud de biorresiduos como consecuencia de la actividad de las industrias procesadoras, muchos de los cuales han sido estudiados como fuente de compuestos antioxidantes. Entre ellos se podrían destacar las pieles y semillas de bayas que se emplean en la elaboración de vinos y zumos (Saura-Calixto, 1998; Larrosa et al., 2002; Lapornik et al., 2005), los subproductos de la elaboración del aceite de oliva, las pieles y las semillas de las industrias de los cítricos (Ignat et al., 2011; de Moraes-Barros et al., 2012) y la piel de manzana (*Malus domestica* Borkh) (Wolfe & Liu, 2003). En la actualidad, la mayoría de los esfuerzos en investigación se están centrando en los biorresiduos de frutos tropicales y subtropicales debido a su riqueza en compuestos fenólicos (Tabla 2) (González & González, 2010; Ayala-Zavala et al., 2011).

Los compuestos fenólicos constituyen el grupo de compuestos bioactivos más importante contenidos en los biorresiduos. Este tipo de compuestos son metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran muy relacionados de forma con la calidad sensorial y bioactiva de las frutas y hortalizas (Veberic et al., 2010). Muestran una amplia gama de propiedades fisiológicas tales como las de ser antialergénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antiaterogénicos, antitrombóticos, cardioprotectores y vasodilatadores (Balasundram et al., 2006; Aguilera et al., 2011).

Estructuralmente (Figura 3), los compuestos fenólicos poseen uno o varios anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes (Ignat et al., 2011). Debido a la diversidad estructural que presentan, son a menudo conocidos

como polifenoles (Balasundram et al., 2006); además, en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que se unen a ese anillo se dividen en varias clases (Ignat et al., 2011). Su clasificación es una tarea compleja debido a que se han identificado más de 8.000 compuestos fenólicos (Ignat et al., 2011) con estructura muy variada; sin embargo, se ha podido establecer una clasificación general en función de su estructura química básica (Tabla 3).

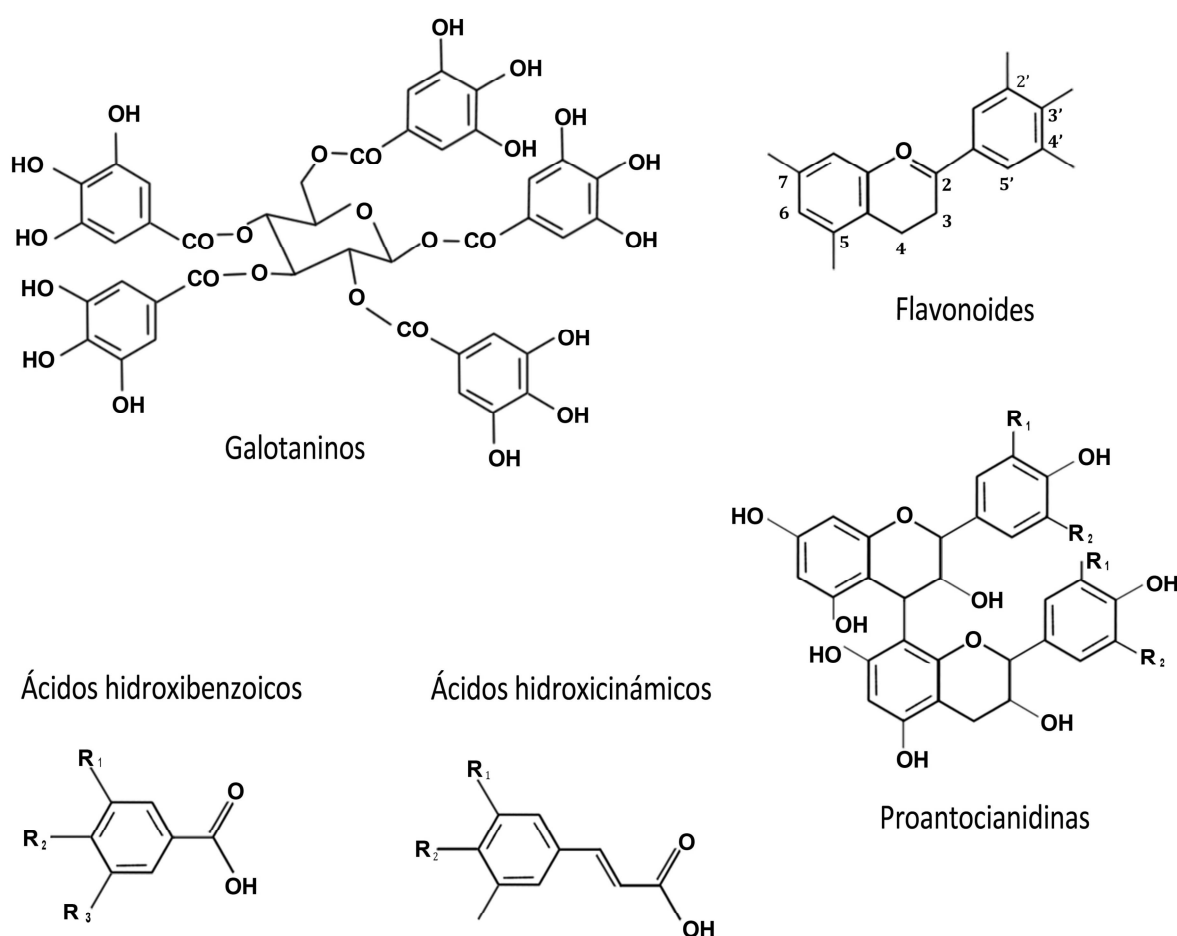


Figura 3. Estructuras químicas de las principales clases de compuestos fenólicos (Fuente: Ignat et al., 2011)

A menudo, los compuestos fenólicos se encuentran conjugados con mono y polisacáridos, unidos a uno o más grupos fenólicos, y puede ocurrir también que se unan a ésteres o metil-ésteres (Balasundram et al., 2006). Los principales grupos de polifenoles presentes en las frutas y hortalizas son los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos (Balasundram et al., 2006) (Figura 3).

Tabla 3. Clasificación de compuestos fenólicos presentes en plantas, en función del esqueleto de su estructura química (Fuente: Balasundram et al., 2006)

Clases	Esqueleto
Fenoles Simples, Benzoquinonas	C ₆
Ácidos Fenólicos	C ₆ -C ₁
Acetofenona, Ácido Fenilacético	C ₆ -C ₂
Ácido hidroxicinámico, Fenilpropanoides (cumarinas, isocumarinas)	C ₆ -C ₃
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, Antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides, Isoflavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Biflavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados (Proantocianidinas)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Los compuestos fenólicos se consideran compuestos antioxidantes debido a la capacidad que presentan de actuar como tales. Desde un punto de vista biológico, un antioxidante se define como cualquier sustancia que, en concentraciones bajas en relación con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación del sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1995). Numerosos estudios demuestran que los compuestos fenólicos reducen la oxidación *in-vitro* de lipoproteínas de baja densidad y/o atrapan los radicales libres responsables de la oxidación lipídica y del daño celular (Moure et al., 2001). Estos compuestos también son potentes antimicrobianos y, al igual que en el caso de la actividad antioxidante, el(los) sitio(s) y el número de grupos hidroxilos en el anillo fenólico están relacionados con dicha capacidad antimicrobiana. Existen evidencias que demuestran que un aumento en la hidroxilación tiene como consecuencia un aumento de la toxicidad sobre los microorganismos (Ayala-Zavala et al., 2011).

3. Compuestos bioactivos presentes mango

Numerosos estudios demuestran que los biorresiduos obtenidos a partir del mango (piel y semilla) son una fuente excelente de compuestos bioactivos tales

como compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles y esteroides y que éstos son responsables de la actividad antioxidante que presentan estos residuos. En la piel y semilla de mango se han identificado diferentes compuestos fenólicos principalmente flavonoides, xantonas, galotaninos, derivados de benzofenonas, ácido elágico, ácido benzoico, etc. (Schieber et al., 2003; Bernardini et al., 2004; Barreto et al., 2008; Sáyago-Ayerdi et al., 2013). En 2012, Kim et al. (2012) determinaron que el extracto de piel de mango es una excelente fuente de quercetina 3-*O*-galactósido, mangiferina, mangiferina galato, isomangiferina galato, quercetina-3-*O*-arabinopiranosido, y de ácidos grasos insaturados. Estos autores sugieren que la piel de mango puede ayudar a prevenir el cáncer de cuello uterino, además de poder ser un agente útil para el tratamiento de otros tumores malignos. Recientemente, Ajila & Prasada-Rao (2013) demostraron que la fibra de la piel de mango (variedades “Raspuri” y “Badami”) presentaba un contenido de fenoles totales entre 81 a 295 g/100 g MS. Los principales fenoles asociados a la fibra que se identificaron fueron el ácido gálico, el ácido protocateico, el ácido sirínico, el kaempferol, la quercetina, el ácido ferúlico y la rutina. En la [Tabla 4](#) se resumen los diferentes compuestos bioactivos que se han descrito en mango.

Debido a que los biorresiduos de mango son muy ricos en compuestos bioactivos han sido estudiados como fuente natural y alternativa de antioxidantes para uso en alimentos, tales como galletas, aceites vegetales, papas fritas, mantequilla de búfalo (Arogba, 1999; Puravankara et al., 2000; Abdalla et al., 2007a; Ajila et al., 2008). Los extractos de semilla de mango se han usado como aditivos antioxidantes en aceite de girasol, comprobándose que la adición de este extracto a una concentración de 800 mg/l disminuía los valores de los índices peróxido y anisidina con respecto al control (sin extracto) (Abdalla et al., 2007a). El aceite con extracto también se empleó para la fritura de papas y posteriormente se almacenaron, observándose que los valores de los índices peróxido y anisidina disminuían hasta cuatro veces respecto del control, incluso siete días después de la fritura cuando el aceite de girasol contenía el extracto de semilla de mango (Abdalla et al., 2007a).

Tabla 4. Compuestos bioactivos descritos en mango (Fuente: Ribeiro & Schieber, 2010)

Compuesto Bioactivo	Parte de la fruta
Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico	Pulpa
Carotenoides: β - caroteno, ζ -caroteno, α -criptoxantina, violaxantina, luteoxantina, mutatoxantina, auroxantina	Pulpa
Polifenoles: mangiferina, isomangiferina, homomangiferina, quercetina, kaempferol, antocianinas	Pulpa, pedúnculo, semilla, piel, hojas, ramas
Ácidos fenólicos: gálico, protocatéquico, ferúlico, cafeico, cumárico, elágico, cumárico, 4-cafeoilquínico	Pulpa, piel, semilla, núcleo interno de la semilla (<i>kernel</i> *)
Otros fenoles: alk(en)ilresorcinoles	Piel, savia
Fibra	Piel, semilla, pulpa
Terpenoides: α -pineno, β -pineno, β -mirceno, limoneno, cis-ocimeno, trans-ocimeno, terpineol, α -guaieno, camfeno, fencheno, α -humuleno y otros (lactonas, aldehídos, ácidos, sesquiterpenos, ésteres y alcoholes alifáticos)	Pulpa, piel, savia
Minerales: potasio, cobre, zinc, manganeso, hierro, selenio	Pulpa, piel, semilla, corteza del pedúnculo

**Kernel*, semilla de mango que incluye testa y embrión

Puravankara et al. (2000) observaron que la adición de extractos obtenidos a partir de la semilla de mango aumentaba hasta ocho veces la estabilidad de la mantequilla de búfalo (*buffalo ghee*) frente a la autoxidación. En 2010, Ajila et al. (2010) incorporaron piel de mango en la elaboración de pasta con el objetivo de evaluar la calidad de la cocción, la firmeza, las características nutracéuticas y sensoriales de la pasta. Se produjo un aumento en el total de fibra (8,6-17,8%); el contenido en polifenoles y carotenoides aumentó desde 46 hasta 180 mg/100 g MS y desde 0,5 hasta 8,4 mg/100 g MS respectivamente cuando se incorporó un 7,5% de piel deshidratada de mango a la pasta. Por lo tanto, mediante la incorporación de piel de mango es posible mejorar la calidad nutricional de los macarrones sin afectar a su cocción, textura y propiedades sensoriales.

El uso de residuos vegetales ha avanzado en los últimos años muchísimo, de tal manera que recientemente Yang & Li (2013) han desarrollado nanopartículas de plata con extractos de piel de mango, con el objetivo de ser empleadas en la administración de fármacos, como biosensores, bio-imágenes e incluso en la conservación de alimentos debido a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del material vegetal.

En cuanto a la actividad antioxidante mostrada por los extractos obtenidos a partir de la piel y la semilla del mango, los resultados obtenidos por diferentes estudios han demostrado que hay diferentes factores involucrados en la actividad antioxidante. A modo de ejemplo, Kim et al. (2010), demostraron las diferentes capacidades de atrapar radicales libres mostrada por la piel de mango (variedad "Irwin") en dos estados de madurez, de tal manera que la capacidad de atrapamiento de la piel inmadura aumentó en un 1,72%, 48% y 93% al aumentar las concentraciones de los extractos entre 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, y 50 µg/ml, respectivamente; sin embargo, para los extractos de piel de mango maduro el aumento de la actividad fue de un 3,99%, 6,67% y 82% para las mismas concentraciones de extracto evaluadas. Los estudios de Maisuthisakul & Gordon (2009) con extractos de semilla obtenidos mediante diferentes métodos de extracción (*método 1*, etanol:agua (95:5, v:v) 3h en agitación; *método 2*, etanol 3h en reflujo; *método 3*, ácido clorhídrico (1 M) en etanol 3h en reflujo) demostraron que los extractos tenían diferentes capacidades de atrapamiento del radical ABTS^{•+} que oscilaban entre 11,0 y 25,8 g actividad antioxidante equivalente al trolox (TEAC)/100 g MS dependiendo del método de extracción empleado.

Las propiedades antimicrobianas de la semilla de mango también han sido evaluadas. Kabuki et al. (2000) investigaron las propiedades antimicrobianas de los extractos obtenidos a partir de ésta frente a 18 especies de patógenos alimentarios. En general, el extracto de semilla de mango fue más efectivo contra las bacterias gram-positivas que contra las gram-negativas. Recientemente, se ha estudiado la actividad antimicrobiana y el modo de acción de galotaninos obtenidos a partir de la semilla de mango. *Bacillus spp*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* fueron las bacterias más sensibles a los galotaninos de entre las estudiadas,

Escherichia coli y *Staphylococcus warneri* fueron parcialmente inhibidas y *Pediococcus acidilactici* fue resistente (Engels et al., 2011). Por otra parte, los estudios realizados referidos a la actividad antimicrobiana de la piel de mango son escasos. En 2011, Souto de Oliveira et al. (2011) señalaron que los extractos etanólicos obtenidos a partir de dicho biorresiduo no tenían actividad antibacteriana frente a tres cepas de *S. aureus* a una concentración de 1,02 µg/ml.

4. Obtención de compuestos bioactivos a partir de biorresiduos

En la obtención de extractos con un alto contenido en compuestos bioactivos, y por lo tanto con una alta actividad antioxidante y/o antimicrobiana, a partir de biorresiduos se deben tener en cuenta diferentes aspectos y estrategias, ya que es que es imposible llevar a cabo un único sistema extracción para todos los biorresiduos (González & González, 2010). En general, en este tipo de procesos se deben realizar tres pasos comunes: muestreo, estabilización del material vegetal durante el almacenamiento del mismo y obtención del extracto a partir del material vegetal (González & González, 2010; Azmir et al., 2013).

4.1. Origen y estado de madurez de la fruta a partir de la que se obtiene el biorresiduo

En la obtención de extractos con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas es fundamental tener en cuenta que existen factores como la variedad de la fruta u hortaliza a partir de las que se obtiene el biorresiduo, la región donde se cultiva, así como el año del cultivo, que afectan de forma importante a la composición en compuestos bioactivos de los mismos. En cuanto a la variedad empleada, Berardini et al. (2005a) encontraron importantes diferencias en la piel de 14 variedades de mango; así las variedades “Tommy Atkins” y “Chok Anan” presentaron mayor contenido en mangiferina (0,125-0,130 g/100 g MS) mientras que las variedades “Haden”, “Heidi” y “Tommy Atkins” se caracterizaron por su alto contenido en flavonoides (0,27-0,30 g/100 g MS). En relación a los flavonoles y las xantonas glicosiladas, la variedad “Tommy Atkins” presentó 12

veces mayor contenido (0,444 g/100 g MS) que la variedad “Mon Duen Gao” (0,0354 g/ 100 g MS).

Otro aspecto a tener en cuenta, especialmente en la obtención de extractos a partir de biorresiduos de frutos climatéricos, es el estado de madurez de la fruta en el momento en el que se obtienen los biorresiduos, ya que el contenido en compuestos bioactivos varía mucho dependiendo de la madurez del fruto (Ajila et al., 2007a). Las frutas climatéricas normalmente se cosechan en madurez fisiológica y luego se dejan madurar a temperatura ambiente o en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa hasta que alcanzan la maduración de consumo. Por lo tanto, antes de la obtención del biorresiduo, es esencial determinar el estado de maduración en el que se encuentra la fruta, mediante la caracterización del color de la piel y de la pulpa, firmeza, sólidos solubles totales, pH y acidez titulable (González & González, 2010). Ajila et al. (2007a) determinaron que la piel del mango maduro de las variedades “Badami” y “Raspuri” presentó entre 2-6 veces mayor contenido en compuestos carotenoides que la piel de la fruta inmadura. Sin embargo, en la piel del mangostán inmaduro el contenido de compuestos fenólicos y taninos es mayor que en la piel del fruto maduro (Pothitirat et al., 2009). Kim et al. (2010) demostraron también que el estado de madurez del mango influía en el contenido de fenoles y flavonoides totales (Tabla 1, sección 1), siendo éste 1,3 veces mayor en las pieles inmaduras que en las maduras.

Como se ha mencionado anteriormente, el tipo de biorresiduo (piel o semilla) también es un factor determinante en el contenido en compuestos bioactivos (Moure et al., 2001). En 2008, Ribeiro et al. (2008) estudiaron el contenido en flavonoles y xantonas glicosiladas en piel y en semilla de mango, presentando la piel de mango mayor contenido en compuestos bioactivos totales (0,109 g/100 g MS) que la semilla (0,00465 g/100 g MS).

Por lo tanto, para obtener extractos con una alta capacidad antioxidante y/o antimicrobiana se hace indispensable la caracterización del material vegetal de partida, puesto que en función de cada uno de los parámetros que se han mencionado el contenido en compuestos bioactivos puede variar sustancialmente en los mismos.

4.2. Estabilización de la muestra

Las condiciones en las que se produce el almacenamiento de la muestra son determinantes, ya que a menudo puede pasar bastante tiempo desde la obtención del biorresiduo hasta la extracción de los compuestos bioactivos, y puede ocurrir que éstos pierdan rápidamente su bioactividad si no se almacenan adecuadamente (González & González, 2010). Por otra parte, se debe tener en cuenta que los biorresiduos frescos tienen un alto contenido de humedad lo que favorece el crecimiento de microorganismos y además pueden ocurrir reacciones enzimáticas y químicas entre los compuestos bioactivos. Todo esto hace necesario desarrollar estrategias que permitan estabilizar la muestra para evitar la degradación de los compuestos responsables de la bioactividad durante su almacenamiento.

Por lo tanto, un paso esencial durante el almacenamiento es disminuir el contenido en agua mediante secado (Mrad et al., 2012); de esta manera se consigue mantener el contenido en compuestos bioactivos del material de partida (González & González, 2010). De forma técnica se puede definir el proceso de deshidratación como aquel que permite eliminar por evaporación o sublimación la mayor parte del agua del material vegetal que se quiere estabilizar. Los procedimientos de deshidratación pueden clasificarse en tres categorías principales:

Secado, por aire o por contacto, a la presión atmosférica. El calor se aporta al material vegetal por aire caliente (convección) o mediante una superficie caliente (conducción). En ambos casos, el vapor de agua formado se mezcla con el aire, siendo éste el medio que sirve para eliminar el vapor.

Secado bajo vacío. El procedimiento tiene la ventaja de que la presión reducida facilita la evaporación del agua, pudiendo utilizarse temperaturas más bajas y/o tiempos de secado más cortos que cuando el proceso tiene lugar a la presión atmosférica. La transferencia de calor se efectúa por conducción o por radiación. Generalmente, el vapor de agua se elimina por condensación en estado líquido o por aspiración (eyector de vapor).

Crio-desección o liofilización. Primero se congela el material vegetal y después se sublima el hielo formado (transformación directa en vapor de agua), en condiciones apropiadas de temperatura y presión. Este

procedimiento en “fase sólida”, conserva la estructura del material vegetal en mayor medida que otros tratamientos de deshidratación.

El tiempo y la temperatura de secado, así como el método usado para realizar dicho proceso afectan a la actividad y la estabilidad de los compuestos bioactivos debido al encadenamiento de reacciones de degradación química y enzimática y/o pérdidas por volatilización o por descomposición térmica (Ghanem et al., 2012; Winjngaard et al., 2012). Se han realizado numerosos estudios para determinar el efecto de estos factores en el contenido en compuestos bioactivos. En 1997, Larrauri et al. (1997) estudiaron el efecto de la temperatura de secado sobre el contenido en compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante de piel de uva y concluyeron que temperaturas entre 100 y 140 °C reducían la actividad antioxidante entre el 28 y 50%, respectivamente. Wolfe & Liu (2003) destacaron que la piel de manzana secada al aire o liofilizada conservaba mejor los fenoles, flavonoides y antocianinas (con contenidos similares a los de la piel fresca) que la piel secada en estufa con aire forzado a 40, 60 u 80 °C. En 2011, Vashisth et al. (2011) evaluaron el efecto, sobre la actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales de extractos procedentes de subproductos de la elaboración del vino, de diferentes regímenes de tiempo-temperatura usando tres métodos de deshidratación (secado al vacío, aire caliente y liofilización): Los resultados revelaron que los residuos deshidratados mediante liofilización (10,3 g equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g MS), secado al vacío (9,83 g GAE/100 g MS) y secado con aire caliente (9,56 g GAE/100 g MS) no presentaron diferencias significativas entre ellos, por lo que podrían ser utilizados como sistemas adecuados de deshidratación, considerándose especialmente el secado al vacío como una técnica prometedora con la que se conseguía la misma preservación de las propiedades antioxidantes y contenido en fenoles que para el sistema de liofilización.

Berardini et al. (2005b) investigaron el efecto del secado a tres temperaturas (50, 70 y 90 °C) y la liofilización sobre el contenido en compuestos fenólicos totales de la piel de mango. Así el contenido en compuestos fenólicos disminuyó entre un 1% (piel secada a 50 °C) y un 6% (piel secada a 70 °C) respecto al de la piel liofilizada. Además observaron que los cambios no eran solo cuantitativos sino

también cualitativos comprobando que el contenido en mangiferina disminuyó cuando el secado se realizó a elevadas temperaturas respecto a cuando la piel fue liofilizada. Similar comportamiento se observó para el quercetin 3-O-galactósido el cual mostró una disminución superior al 35% a altas temperaturas cuando se comparó con la piel liofilizada.

4.3. El proceso de extracción

Un vez estabilizado el material vegetal, el siguiente paso para obtener extractos con alto contenido en compuestos bioactivos es la extracción, siendo ésta un paso esencial que determinará la calidad final del extracto en términos de actividad antioxidante y/o antimicrobiana.

Las características químicas del disolvente, la estructura y la composición diversa de los productos naturales hacen que cada sistema biorresiduo-disolvente se comporte de diferente manera durante el proceso de extracción (González & González, 2010; González-Montelongo et al., 2010a; González-Montelongo et al., 2010b). Además, otros factores, tales como el tiempo de contacto entre el material vegetal y el extractante, la temperatura, el número de ciclos de extracción, la relación peso de material vegetal y volumen de disolvente y la técnica de extracción, influyen significativamente en la eficiencia con la que se obtienen los ingredientes activos a partir de los biorresiduos (González & González, 2010). A continuación, se explicará en detalle cómo influyen estos factores en la obtención de extractos ricos en antioxidantes y/o antimicrobianos.

4.3.1. Disolvente de extracción

Es prácticamente imposible desarrollar un método eficiente para obtener compuestos fitoquímicos a partir de biorresiduos con un único sistema de disolventes, debido a que la polaridad de los diferentes compuestos, la manera en que están asociados los compuestos bioactivos así como la matriz de la que provienen hacen que el sistema sea muy variable (Naczk & Shahidi, 2006; Azmir et al., 2013).

La polaridad del compuesto objetivo es uno de los factores más importantes en la elección del disolvente; otros factores como la afinidad molecular entre el disolvente y el soluto, la transferencia de masa, el uso de co-disolventes, la seguridad ambiental, la toxicidad humana y la viabilidad financiera también se deben tener en cuenta en la selección del disolvente de extracción (Azmir et al., 2013). En la [Tabla 5](#) aparecen diferentes ejemplos de compuestos bioactivos extraídos por medio de diferentes disolventes.

Tabla 5. Disolventes de uso común para la extracción de compuestos fenólicos (Fuente: Azmir et al., 2013)

Compuestos bioactivos	Disolvente
Antocianinas, Taninos, Saponinos, Terpenoides	Agua
Taninos, Polifenoles, Flavonoles, Terpenoides, Alcaloides	Etanol
Antocianinas, Terpenoides, Saponinas, Taninos, Flavonas, Polifenoles	Metanol
Flavonoides	Acetona
Terpenoides, Flavonoides	Cloroformo
Terpenoides	Diclorometano
Alcaloides, Terpenoides	Éter

La extracción directa usando disolventes es la técnica más común empleada para obtener extractos con alto contenido en compuestos bioactivos a partir de la piel y semillas de frutas y hortalizas (González & González, 2010). El agua, el metanol, el etanol y la acetona son los disolventes usados generalmente como extractantes. Sin embargo, en la extracción de compuestos fenólicos las mezclas de los disolventes mencionados (entre 50 y 90%) con agua son los extractantes más ampliamente utilizados (Wijekoon et al., 2011; Meneses et al., 2013). En general, los compuestos fenólicos en formas agliconas altamente hidroxiladas son solubles en alcoholes. Para la extracción de compuestos menos polares y formas altamente metoxiladas, muy comunes en la piel de los frutos, se usan disolventes menos polares como el acetato de etilo, la acetona y el cloroformo ([Tabla 5](#)).

En 2012, Cheok et al. (2012) evaluaron el efecto de la polaridad de distintos disolventes (acetato de etilo, isopropanol, acetona, etanol, metanol y agua) en la

extracción de compuestos fenólicos a partir de la cáscara del mangostán. Estos autores concluyeron que el contenido total de fenoles en los extractos es directamente proporcional a la constante dieléctrica del disolvente orgánico utilizado ($R^2 = 0,937$). El metanol, que es el disolvente con mayor constante dieléctrica de los disolventes evaluados, fue el disolvente más efectivo en la obtención de compuestos fenólicos (7,50 GAE/100 g MS), seguido de la acetona (5,89 g GAE/100 g MS) y el etanol (5,28 g GAE/100 g MS). El agua, por el contrario, fue el peor disolvente de extracción (1,01 g GAE/100 g MS). Sin embargo, se demostró que el poder de extracción de un disolvente no depende únicamente de la constante dieléctrica sino también de la polaridad de los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal, así como de la estructura química del disolvente de extracción. González-Montelongo et al. (2010b) evaluaron el efecto del uso de diferentes disolventes para la obtención de extractos a partir de piel de plátano. Los resultados demostraron diferencias significativas entre los siete disolventes evaluados (metanol, etanol, acetona, metanol:agua (50:50, v:v), etanol:agua (50:50, v:v), acetona:agua (50:50, v:v), siendo la mezcla acetona:agua (50:50, v:v) la que mejoró la actividad antioxidante (entre 1,3-35 veces mayor capacidad de atrapamiento de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}) y el contenido en fenoles totales en los extractos. En 2012, Tabaraki et al. (2012) determinaron el efecto del uso de diferentes concentraciones en la mezcla etanol:agua para la obtención de extractos ricos en compuestos antioxidantes a partir de piel de granada. En general se observó que la adición de agua a la mezcla incrementaba la polaridad de la mezcla extractante; así, se observó un incremento en el contenido en fenoles totales de 5,62 g GAE/100 g MS en los extractos obtenidos con la mezcla de disolvente 30:70 (v:v) a 6,91 g GAE/100 g MS en los obtenidos con la mezcla 70:30 (v:v).

Recientemente, se evaluó el uso de diferentes disolventes (metanol, etanol, acetona, hexano, acetato de etilo, agua y mezclas con agua de etanol, metanol y acetona) para la extracción de compuestos fenólicos a partir del bagazo de cerveza. El mayor atrapamiento del radical DPPH[•] se observó para los extractos obtenidos con acetona:agua al 60:40 (v:v) ($18,6 \pm 1,0\%$ inhibición DPPH[•]), mientras que cuando el disolvente de extracción fue acetona:agua al 20:80 (v:v) se observó una

importante disminución de la capacidad de atrapamiento ($7,46 \pm 1,29\%$ inhibición DPPH*) (Meneses et al., 2013).

En el caso de la piel y la semilla del mango, la estructura diversa de los compuestos bioactivos hace que sea esencial la elección del disolvente adecuado para su extracción. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento en estos biorresiduos utilizan de forma general y no específica los disolventes más comunes empleados para la extracción de compuestos fenólicos. En la [Tabla 6](#), se puede ver un resumen de los disolventes utilizados en la obtención de compuestos bioactivos a partir de biorresiduos de mango.

Las mezclas con metanol, etanol, acetona con agua (entre el 50 y 95%) son los disolventes más empleados (Kabuki et al., 2000; Soong & Barlow, 2004; Berardini et al., 2005a; Soong & Barlow, 2006; Abdalla et al., 2007a; Abdalla et al., 2007b; Ajila et al., 2007a; Ajila et al., 2007b), sin embargo, también se han utilizado el metanol y el etanol como disolventes de extracción (Barreto et al., 2008; Nithitanakool et al., 2009).

Las diferencias encontradas tanto en la actividad antioxidante como en el contenido en compuestos fenólicos, en las distintas referencias bibliográficas, dejan patente que la elección del disolvente de extracción deber ser una decisión importante que determinará la eficiencia de los extractos.

Tabla 6. Cuadro resumen de diferentes procesos de extracción de compuestos bioactivos a partir de piel y semilla de mango (Fuente: González & González, 2010)

Biorresiduo	Variiedad	Compuestos Bioactivos	Extracción
Piel	"Irwin"	Fenoles Totales y flavonoides	Biorresiduo seco con etanol:agua (80:20, v:v) con ultrasonidos a temperatura ambiente durante 3 días
Piel	"Raspuri", "Badami", "Willard", "Karutha", "Colomban", "Vellai", "Colomban", "Ampalavi" y/o "Malgova"	Fenoles Totales	Biorresiduo fresco con etanol:agua (80:20, v:v) o acetona:agua (80:20, v:v) a 70 °C durante 2h
Piel	"Carabao"	Ácidos Fenólicos	Biorresiduo seco con etanol:agua (90:10, v:v) bajo reflujo, 3 veces Extracción del residuo con acetato de etilo, 4 veces
Piel y/o kernel*	"Ubá", "Tommy Atkins", "Manila", "Ngowe", "R2E2", "Kent", "José", "Mini-mango", "Haden, Heidi, "Kaew, Mon Duen Gao", "Maha Chamoxh", "Nam Dokmai" y/o "Chock Anan"	Flavonoles y Xantonas glicosiladas	Biorresiduo seco con etanol:agua (80:20, v:v) (+ácido acético) bajo nitrógeno durante 3h, 2 veces
Piel y/o kernel*	"Tommy Atkins"	Galotaninos	Biorresiduo seco con etanol:agua (80:20, v:v) (+ácido ascórbico) bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 6h, 2 veces

*Kernel, semilla de mango que incluye testa y embrión

Tabla 6 (continuación). (Fuente: González & González, 2010)

Biorresiduo	Variiedad	Compuestos Bioactivos	Extracción
<i>Kernel*</i>	“Fahlun”	Ácidos fenólicos y compuestos fenólicos	Biorresiduo fresco con etanol a 80 °C
<i>Kernel*</i>	“Chok-Anan”	Fenoles Totales	Biorresiduo seco con etanol:agua (95:5, v:v) en reflujo durante 3 h
<i>Kernel*</i>	“Rajapuri”, “Sangra”, “Kaiser”, “Alphonso”, “DESI”	Fenoles Totales	Biorresiduo seco con cloroformo:metanol (2:1, v:v) agitación 1h, reposo la noche
<i>Kernel*</i>	“Zebda”, “Balady”, “Succary”	Ácidos Fenólicos y Cinámicos, Taninos y Xantonas	Biorresiduo seco con metanol:agua (95:5, v:v) a 4 °C durante 4 min
<i>Kernel*</i>	“Kaen”	Galotaninos	Biorresiduo seco con acetona:agua (80:20, v:v) (+ácido ascórbico) bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 6h, 2 veces
<i>Kernel*</i>	-----	Fenoles Totales	Biorresiduo fresco con etanol:agua (99,5:0,5, v:v) toda la noche
<i>Kernel*</i>	-----	Ácidos fenólicos	Biorresiduo seco con etanol:agua (50:50, v:v) a 70 °C durante 1h

**Kernel*, semilla de mango que incluye testa y embrión

Otro aspecto a tener en cuenta en la extracción de compuestos bioactivos, a partir de material vegetal, es que el uso de disolventes orgánicos por la industria alimentaria, en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes, está estrictamente regulado (Directiva 88/344/CEE, Consejo de la Unión Europea, 1988; Directiva 92/115/CEE, Consejo de la Unión Europea, 1992; Directiva 94/52/CE, Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 1994; Directiva 97/60/CE, Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 1997). Recientemente, a nivel nacional y de acuerdo con las Directivas Europeas, se ha publicado una lista con los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes; según el RD 1101/2011 (Ministerio de Sanidad,

Política Social e Igualdad del Gobierno de España, 2011) se considera que un disolvente de extracción se utiliza respetando las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) si su empleo sólo produce la aparición de residuos o de derivados y en cantidades técnicamente inevitables y que no suponen riesgo para la salud humana. En dicho Real Decreto, los disolventes de extracción cuya utilización está permitida respetando las BPF, para todos los usos, son el propano, butano, acetato de etilo, etanol, anhídrido carbónico, acetona y protóxido de nitrógeno. La mayoría de las extracciones llevadas a cabo para la obtención de compuestos bioactivos a partir de biorresiduos de mango utilizan mezclas de disolventes orgánicos con agua (Tabla 6); en este sentido, la Directiva Comunitaria 88/344/CEE (Consejo de la Unión Europea, 1988) especifica que el agua, a la que pueden añadirse sustancias que regulen la acidez o la alcalinidad así como otras sustancias que posean propiedades disolventes, estará autorizada como disolvente de extracción en la fabricación de productos alimenticios o de sus ingredientes. Sin embargo, las mezclas con metanol están reguladas debido a que para dicho disolvente hay una especificación del residuo máximo de 10 mg/kg del mismo en los productos alimenticios o en los ingredientes extraídos (RD 1101/2011, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España 2011). Por el contrario, el etanol y la acetona y por ende las mezclas de éstos con agua se consideran como disolventes respetuosos con el medioambiente y seguros desde el punto de vista alimentario.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es el efecto del pH del agua en la extracción de compuestos bioactivos (Moure et al., 2001). En el caso de la extracción de antocianinas, bajos valores de pH previenen la degradación de estos pigmentos (González & González, 2010).

También es importante considerar la actividad de la enzima polifenol-oxidasa, responsable de la degradación de los polifenoles (Ortega-García et al., 2010). En los extractos acuosos la enzima permanece activa mientras que cuando se emplean otros disolventes, la enzima se inactiva evitándose la degradación de los compuestos fenólicos (González-Montelongo et al., 2010b).

4.3.2. Temperatura de extracción

La extracción de compuestos fenólicos se realiza generalmente a temperatura ambiente, entre 20-30 °C (González & González, 2010). Sin embargo, se ha descrito que incrementos de temperatura mejoran la eficiencia de la extracción debido a una mejora en la difusión y en la solubilidad de los compuestos fitoquímicos en el disolvente. Por lo tanto, en algunos casos se usan disolventes a elevada temperaturas (entre 37 y 90 °C) o reflujo para la extracción de compuestos bioactivos a partir de biorresiduos (González & González, 2010).

Además, la temperatura durante el secado (sección 4.2) y la extracción puede afectar a la estabilidad de los compuestos fitoquímicos, debido a que se puede producir degradación química y enzimática, pérdida por volatilización o descomposición térmica; estos dos últimos mecanismos se consideran las principales causas en la reducción de los polifenoles (Moure et al., 2001). Por otra parte, puede ocurrir que la descomposición térmica haga reaccionar a los fenoles con otros componentes del material vegetal lo que hace que se impida su posterior extracción (Moure et al., 2001).

En la obtención de compuestos antioxidantes a partir de piel de plátano, González-Montelongo et al. (2010a) demostraron que la temperatura de extracción favorecía la obtención de extractos con mayor capacidad para prevenir la peroxidación lipídica mientras que la capacidad de los extractos para atrapar radicales libres (ABTS^{•+} or DPPH[•]) o el contenido en compuestos fenólicos no se vio favorecido aumentando la temperatura. Esto podría indicar que es más difícil extraer compuestos bioactivos capaces de inhibir la peroxidación lipídica a bajas temperaturas (posiblemente por su baja solubilidad en los disolventes) que extraer compuestos que atrapen radicales libres. En la optimización de las condiciones de extracción a partir de la piel de cítricos se observó que temperaturas entre 40-100 °C no mejoraban el contenido en compuestos fenólicos ni tampoco la capacidad antioxidante de los extractos (Xu et al., 2008).

En el caso de los biorresiduos de mango (Tabla 6), las temperaturas empleadas en las extracciones han sido muy variadas desde los 4 hasta los 80 °C. Abadalla et al. (2007b) utilizaron metanol:agua (95:5, v:v) a 4 °C para extraer los

fenoles presentes en la semilla de mango, obteniendo un contenido en fenoles totales de los extractos de 0,112 g/100 g MS. Sin embargo, Soong & Barlow (2004) realizaron la extracción en etanol:agua (50:50, v:v) a 70 °C y obtuvieron un contenido mucho mayor en fenoles totales (11,7 g/100 g MS). Ajila et al. (2007a, 2007b) extrajeron 7,38 g fenoles/100 g MS, a partir de la piel de mango, con etanol:agua (80:20, v:v) a temperatura ambiente.

4.3.3. Tiempo de extracción

Numerosos estudios demuestran la gran influencia del tiempo en la extracción de compuestos bioactivos a partir de biorresiduos. En el caso de la extracción a partir de frutas tropicales y subtropicales se han empleado tiempos cortos (entre 1-30 min), horas (entre 1-12h) o incluso días (entre 1-3 días) (González & González, 2010).

El tiempo durante el cual el disolvente de extracción y la matriz están en contacto puede influir en la liberación progresiva del compuesto fitoquímico desde la matriz hacia el disolvente, y por consiguiente puede afectar a la eficiencia de la extracción (Michiels et al., 2012). Sin embargo, puede ocurrir que tiempos largos no se traduzcan en un aumento de la actividad antioxidante. En este sentido, Pinelo et al. (2005) estudiaron el efecto del tiempo en la capacidad de antioxidante de extractos obtenidos a partir de subproductos procedentes de la elaboración de jugo de uva; a tiempos largos (superiores a 30 min) no se mejoraba la extracción. Similares resultados se describieron cuando se obtuvieron extractos antioxidantes a partir de piel de plátano; los extractos obtenidos a tiempos prolongados (120 min) no mostraron mayor capacidad de atrapamiento del radical DPPH[•] que los obtenidos a tiempos más cortos (González-Montelongo et al., 2010a). Spigno et al. (2007) concluyeron que podría ser más conveniente y energéticamente menos caro trabajar a altas temperaturas (60 °C) durante tiempos cortos que a bajas temperaturas durante tiempo largos, para obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante procedentes de residuos de uva. Recientemente, se ha confirmado que el calentamiento suave (temperaturas entre 52 y 67 °C) durante tiempo cortos (de pocos segundos a aproximadamente media

hora) podría debilitar la integridad de la pared celular del material vegetal, hidrolizando los compuestos fenólicos unidos a ésta y mejorando así la solubilidad de los mismos, de tal manera que un mayor número de compuestos fenólicos podrían transferirse al extractante (Tabaraki et al., 2012).

Desde el punto de vista de la eficiencia industrial, los tiempos largos suponen una importante desventaja económica, lo que hace muy importante determinar el tiempo de extracción más corto posible con la mejor eficiencia en cuanto a la obtención de extractos ricos en antioxidantes.

En el caso de los extractos obtenidos a partir de los subproductos del mango (Tabla 6) se han empleado muy distintos tiempos de extracción, desde tiempos muy cortos (4 min) hasta tiempos muy largos (6-72h). Berardini et al. (2005b) realizaron la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la piel de mango durante 3h bajo agitación usando como extractante la mezcla acetona:agua (80:20, v:v), obteniendo un contenido en fenoles totales de 0,407 g GAE/100 g MS. La extracción de compuestos fenólicos a partir de semilla de mango se realizó en agitación durante 4,5h; los extractos obtenidos con etanol:agua (95:5, v:v) mostraron un contenido en fenoles de $8,99 \pm 0,23$ g equivalentes de ácido tánico (TAE)/100 g MS (Maisuthisakul & Gordon, 2009). Al igual que en el caso anterior, la extracción de compuestos antioxidantes a partir de piel de mango se realizó durante 4,5h y con el mismo disolvente (Jiang et al., 2010). Sin embargo, tiempos entre 4 min y 18h se han utilizado también para la obtención de extractos con alto contenido en antioxidantes a partir de residuos de mango (Puravankara et al., 2000; Abdalla et al., 2007a; Abdalla et al., 2007b).

4.3.4. Número de ciclos de extracción

Generalmente en la obtención de extractos ricos en compuestos antioxidantes a partir de residuos de origen vegetal se suele emplear un único ciclo de extracción, sin embargo, en ocasiones se han utilizado entre dos y ocho ciclos (González & González, 2010).

En la obtención de extractos a partir de la piel de plátano, la optimización del proceso de extracción, mediante un diseño experimental, demostró que el

número de ciclos de extracción era el factor que tuvo más efecto en el rendimiento de la extracción, de tal manera que a mayor número de ciclos de extracción se obtenía un mayor rendimiento en términos de actividad antioxidante (González-Montelongo et al., 2010a). Xu et al., 2008 determinaron en piel de cítricos que un segundo ciclo de extracción era necesario para recuperar un mayor número de compuestos fenólicos, con el consiguiente aumento en la capacidad antioxidante de los extractos.

En los estudios realizados a partir de residuos del mango se observa que en general para la obtención de compuestos antioxidantes (galotaninos, galatos, pectinas, flavonoles, flavonoides, xantonas, antocianinas, derivados de benzofenonas, etc.) se realizan entre 2-4 extracciones (Berardini et al., 2004; Soong & Barlow, 2004; Soong & Barlow, 2006; Engels et al., 2009; Engels et al., 2010). Ribeiro et al. (2008) realizaron una extracción simple para la recuperación de compuestos fenólicos a partir de la piel de mango de distintas variedades producidas en Brasil.

4.3.5. Relación volumen de disolvente y peso de material vegetal

La relación entre el volumen de disolvente y la cantidad de material vegetal es otro factor que afecta a la extracción de compuestos antioxidantes a partir de biorresiduos (González & González, 2010). En general, se ha visto que el incremento en dicha relación mejora la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, es aconsejable determinar la relación óptima para evitar fenómenos de saturación que impidan que se extraiga mayor cantidad de compuestos fenólicos (Khoddami et al., 2013). Las relaciones más comúnmente empleadas están entre 1:1 y 10:1 (v:w), aunque también se han utilizado relaciones mayores entre 20:1 y 100:1 (v:w) o entre 125:1 y 250:1 (v:w) (González & González, 2010). Recientemente, se ha descrito que una relación de 60:1 (v:w) y dos ciclos de extracción son suficientes para extraer la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en los tejidos vegetales (Khoddami et al., 2013).

En el caso específico de los biorresiduos del mango, se han empleado varias relaciones entre el volumen de disolvente y la cantidad de material vegetal (entre

3:1 y 125:1, v:p) y en ningún caso se ha justificado u optimizado el empleo de una u otra relación (Puravankara et al., 2000; Ribeiro et al., 2008; Maisuthisakul & Gordon, 2009).

4.3.6. Técnica de extracción

La selección de la técnica empleada para obtener extractos ricos en compuestos antioxidantes a partir de biorresiduos es importante, puesto que de ella depende el rendimiento y la selectividad de la extracción así como el coste económico de la misma; además, hay que tener en cuenta otros aspectos como la seguridad de la técnica y el que sea respetuosa con el medio ambiente (González & González, 2010).

La extracción tradicional con disolventes (*Traditional Extraction*, TE), a pesar de ser la técnica más extendida para la obtención de extractos con alta actividad antioxidante y/o antimicrobiana, presenta muchas desventajas frente a otras técnicas de extracción entre las que se destacan tiempos largos de extracción, la laboriosidad de la técnica, así como la baja selectividad y/o bajo rendimiento de la extracción. También se debe añadir el uso de grandes cantidades de disolventes propio de esta técnica lo que en la industria alimentaria está estrictamente regulado (sección 4.3.1), además de suponer un coste económico elevado para la empresa. Por todo ello, se han desarrollado tecnologías más eficientes, selectivas y más respetuosas con el medioambiente para obtener extractos ricos en compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos a partir de biorresiduos. Entre éstas destacan la extracción con fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE), la extracción asistida por ultrasonidos (*Ultrasound-Assisted Extraction*, UAE), la extracción asistida por microondas (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE), la extracción asistida por altas presiones (*High Pressure-Assisted Extraction*, HPE), la extracción con pulsos eléctricos (*Pulsed Electric Field*, PEF) y variaciones de estas tecnologías como puede ser la extracción asistida por microondas y ultrasonidos (*Ultrasound-Microwave-Assisted Extraction*, UMAE) (Yang et al., 2011; Azmir et al., 2013; Gil-Chávez et al., 2013; Khoddami et al., 2013).

Actualmente, la MAE está entre las técnicas modernas más empleadas ya que con ella se obtienen extractos con una alta calidad a partir de una gran variedad de matrices vegetales y con un gran rendimiento en la extracción. La principal ventaja de esta técnica reside en que el microondas aumenta la temperatura de manera más rápida y efectiva que en la extracción tradicional. Así en el caso del microondas el calor es transferido directamente al material y, por lo tanto, los compuestos bioactivos se liberan más rápida y eficientemente de los compartimentos celulares. Estudios en los que se han realizado microfotografías electrónicas de barrido de diferentes estructuras celulares sometidas a MAE muestran la desestructuración (Figura 4) sufrida por las células (Li et al., 2013).

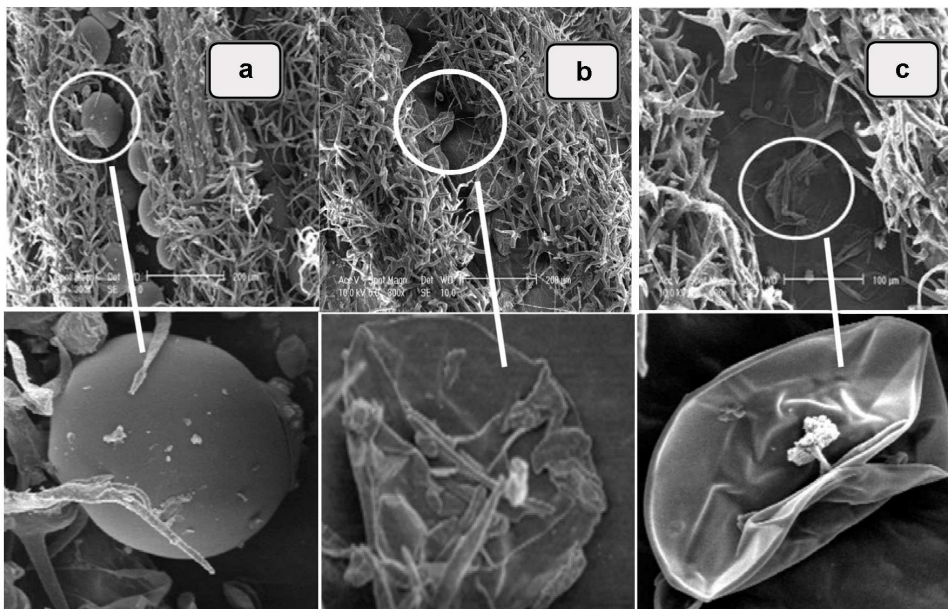


Figura 4. Estructura de flores de lavanda observadas en microscopio electrónico de barrido: antes de la extracción (a); después de MAE (b), y después TE (c). (Fuente: Li et al., 2013)

Sun et al. (2007) observaron a través de microfotografías electrónicas de barrido que la estructura de frambuesa roja después de MAE mostraba una mayor desestructuración que la de las células después de una TE, y es que la irradiación del microondas dio lugar a la ruptura física de la estructura del material vegetal debido a que esta energía posee una mayor selectividad y calentamiento localizado, lo que permite una migración directa de los compuestos bioactivos hacia el disolvente de extracción. En TE en cambio, cuando el disolvente alcanza una temperatura elevada difunde más lentamente hacia el material vegetal, disolviendo y arrastrando hacia la

matriz circundante exterior (disolvente extracción) los compuestos objetivo (Sun et al., 2007). Li et al. (2013) representaron esta desestructuración sufrida por las células como se esquematiza en el [Figura 5](#).

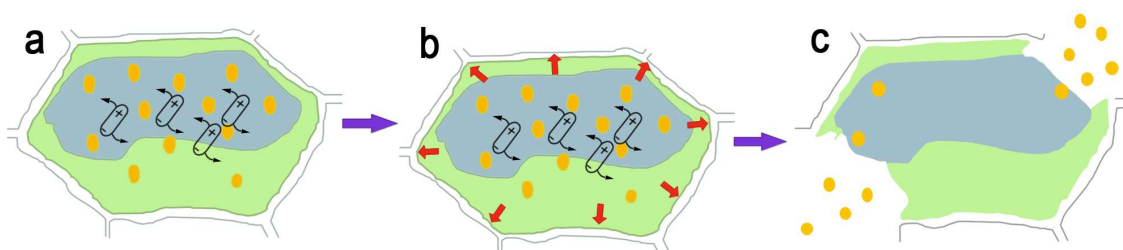


Figura 5. Esquema de la desestructuración sufrida por las células expuestas a la energía de MAE; (a) Rotación del agua celular por la irradiación con microondas, (b) Rápido incremento de la temperatura y de la presión en el interior celular, (c) Rotura celular y liberación de las moléculas objetivo (Fuente: Li et al., 2013)

La MAE posee otras ventajas frente a la TE ya que la cantidad de disolventes utilizados y el tiempo de extracción son mucho menores; por otra parte en la MAE se produce un control exhaustivo de todos los parámetros de la extracción como pueden ser el tiempo y la temperatura (Pan et al., 2008; Desai et al., 2010; González & González, 2010; Routray & Orsat, 2012).

El contenido en fenoles totales en los extractos obtenidos a partir de semilla de uva con MAE ($0,0963 \pm 0,0015$ g GAE/100 g MF, materia fresca) fue mayor que la obtenida con UAE ($0,0541 \pm 0,0015$ g GAE/100 g MF); en cambio, cuando la extracción se realizó de forma tradicional se obtuvo el mayor contenido en fenoles totales (0,110 g GAE /100 g MF). Por otra parte, con la MAE el tiempo de extracción fue menor (4,6 min) al empleado en la TE (200 min) y en la UAE (29 min) (Li et al., 2011). Pérez-Serradilla & Luque de Castro (2011) optimizaron las condiciones de obtención de compuestos fenólicos a partir de los residuos que provienen de la elaboración del vino utilizando MAE. Bajo estas condiciones [mezcla etanol:agua (75:25, v:v), 1:10 (p:v) y a 40 °C], los extractos obtenidos por ambas técnicas no presentaban diferencias en cuanto al contenido en compuestos bioactivos; sin embargo, la extracción con microondas fue mucho más efectiva al poder ser realizada en un tiempo mucho más corto (17 min) que el empleado con la TE (24h).

Se han obtenido extractos con un alto contenido en compuestos fenólicos a partir de hojas de mango utilizando las técnicas de SFE y la extracción con agua subcrítica (*Subcritical Water Extraction, SWE*). La SWE fue más efectiva que la SFE. Además, la alta eficiencia de la SWE fue demostrada al encontrar en los extractos obtenidos mediante dicha técnica elevadas cantidades de mangiferina y quercetina (1,36 y 0,409 g/100 g MS, respectivamente) (Fernández-Ponce et al., 2012).

Justificación Temática

Justificación Temática

Como se expuso en los apartados anteriores la generación de cantidades importantes de biorresiduos por parte de las industrias procesadoras de frutas ha hecho que se intenten buscar alternativas para la valorización de los mismos, y es que una gestión adecuada de los biorresiduos proporciona beneficios no sólo ambientales, sino también sociales y económicos (Unión Europea, 2010).

Según estimaciones de la UE, los biorresiduos representan más del 30% de los residuos sólidos urbanos, lo que supone una fuente importante de emisiones de gases de efecto invernadero, además de causar otros impactos negativos en el medio ambiente cuando se depositan en vertederos (Unión Europea, 2010). Por otro lado, la UE pide a los Estados Miembros la presentación de propuestas para el reciclado y valorización de biorresiduos con el fin de limitar las cantidades de biorresiduos sometidas a soluciones de gestión de residuos menos convenientes, como la eliminación en vertederos o la incineración (Unión Europea, 2010). En este sentido, tal y como se comentó en la Introducción General, la Directiva Comunitaria 1999/31/CE del Consejo de 26 de abril de 1999 (Consejo de la Unión Europea, 1999) establece que debe reducirse la cantidad de desechos orgánicos biodegradables en los vertederos en un 65% en Julio de 2016 (con respecto a la cantidad existente en 1995). Por lo tanto, desde el punto de vista medioambiental y legal, es necesaria la valorización de los residuos, y en particular la de los residuos vegetales.

En este sentido, es necesario impulsar el desarrollo de estrategias de valorización de biorresiduos. En el caso concreto del mango, existen numerosos trabajos relacionados con los biorresiduos procedentes de esta fruta (Schieber et al., 2003; Berardini et al., 2004; Barreto et al., 2008) que lo avalan como un excelente candidato para la valorización y, en concreto, para su utilización como fuente alternativa de compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos naturales. Sin embargo, existe la necesidad de optimizar el proceso de obtención de estos compuestos para poder así lograr el mayor rendimiento de extracción a partir de estos biorresiduos.

En esta Tesis se abordan diferentes aspectos relacionados con la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de la piel y de la semilla de mango (*Mangifera indica* L.). A continuación se hará una breve exposición del contenido de cada uno de los artículos publicados, que han sido fruto del trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral.

- I. Dorta, E., Lobo, M.G. & González, M. (2012). **Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity.** *LWT - Food Science and Technology*, 45, 261-268.

El objetivo principal de este estudio fue determinar qué tratamiento de estabilización del material vegetal (piel y semilla de mango), permitía una adecuada conservación del mismo. La selección de un sistema adecuado de deshidratación es fundamental ya que permitirá almacenar el material vegetal hasta la posterior extracción de los compuestos responsables de la actividad antioxidante y/o antimicrobiana sin que esto suponga una pérdida de dichos compuestos bioactivos. Aunque existen numerosos sistemas para la deshidratación de los productos, en este trabajo se evalúan los más comúnmente empleados: la liofilización y el secado en estufa. El secado se realizó a 70 °C en estufa con aire estático o con aire forzado.

Mediante análisis multivariante se pudo diferenciar y relacionar cómo los diferentes sistemas de deshidratación afectaban a la actividad antioxidante y al contenido en compuestos bioactivos de la piel y semilla de mango.

- II. Dorta, E., Lobo, M.G. & González, M. (2011). **Reutilization of mango by-products: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties.** *Journal of Food Science*, 77, C80-C88.

El objetivo de este estudio fue la optimización de la temperatura y del disolvente de extracción para la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de la piel y de la semilla de mango.

La elección de la temperatura de extracción es determinante ya que puede favorecer tanto la liberación de compuestos bioactivos como la pérdida de los mismos (a temperaturas extremas). En este sentido se evaluaron diferentes temperaturas usadas comúnmente en los procesos de extracción de compuestos bioactivos a partir de material vegetal.

La polaridad del disolvente utilizado en el proceso de obtención de extractos puede influir en gran medida en el tipo de compuesto que se extrae, afectando por tanto a las propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas de los mismos. En este estudio se utilizaron distintos disolventes orgánicos y sus mezclas con agua, siendo seleccionados los que se utilizan más frecuentemente en la extracción de compuestos fenólicos a partir de biorresiduos, debido a que estos compuestos son en su mayoría los responsables de la actividad antioxidante y/o antimicrobiana de los residuos vegetales.

- III. Dorta, E., Lobo, M.G. & González, M. (2013). **Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from mango seed.** *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1067-1081.

En este estudio se evaluó profundamente el efecto de distintos factores involucrados en el proceso de obtención de extractos ricos en antioxidantes a partir de la semilla de mango, y la interacción entre ellos. Los factores estudiados fueron el contenido de agua en la mezcla del disolvente de extracción, el pH del agua en dicho extractante, el tiempo de extracción, el número de pasos del proceso de extracción y la relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente.

Debido a que la presente Tesis Doctoral, en última instancia, pretende contribuir a dar soluciones para la disminución del contenido de biorresiduos en los vertederos, se hace necesario evaluar el uso de nuevas tecnologías de extracción que sean más respetuosas con el medioambiente. Es por ello que en este estudio se emplearon dos técnicas de extracción para las cuales se evaluaron los diferentes factores mencionados anteriormente.

Se utilizó la extracción tradicional con disolventes (*Traditional Extraction*, TE) y la extracción asistida por microondas (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE), con el objetivo de determinar para cada una de ellas los valores óptimos para los factores de la extracción.

Para poder realizar un estudio eficiente de los factores influyentes en la extracción se utilizó la Metodología Superficie-Respuesta (*Response-Surface Methodology*, RSM); mediante dicha metodología estadística se pueden resolver problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo (Montgomery, 2001). El diseño de experimentos seleccionado para realizar este estudio fue el Diseño Central Compuesto (*Central Composite Design*, CCD), el cual permitió realizar un estudio minucioso de los factores influyentes sobre el proceso de extracción, así como las interacciones entre éstos.

- IV.** Dorta, E., Lobo, M.G. & González, M. (2013). **Improving the efficiency of antioxidant extraction from mango peel by using microwave-assisted extraction.** *Plant Foods for Human Nutrition*, doi: 10/1007/s11130-013-0350-4.

Las matrices vegetales tienen un efecto determinante en la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos. No existe un método de extracción universal que pueda ser empleado para matrices vegetales diferentes; es por ello que se evaluaron distintos factores de extracción (contenido de agua en la mezcla del disolvente de extracción, el pH del agua en dicho extractante, el tiempo de extracción, el número de pasos del proceso de extracción y la relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente) que influyen en la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de la piel de mango. Además, al igual que para la semilla de mango, se evaluaron todos estos factores para dos técnicas de extracción (TE y MAE), utilizando la RSM y como diseño experimental el CCD.

Además de las publicaciones citadas anteriormente, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se estudió:

V. La actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de piel y de semilla obtenidos a partir de tres variedades de mango.

Uno de los criterios de optimización de las condiciones de extracción fue el alto contenido en compuestos fenólicos en los extractos, ya que se ha descrito que estos compuestos tienen capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos (García-Ruiz et al., 2012). Con el fin de evaluar las propiedades antimicrobicas de la piel y de la semilla de mango se obtuvieron extractos, en las condiciones de extracción optimizadas, a partir de los residuos de tres variedades de mango (“Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”). La actividad antimicrobiana se evaluó frente a 20 especies de levaduras, seleccionadas principalmente desde el punto de vista de la seguridad y la calidad alimentaria, ya que muchas de ellas son consideradas patógenos humanos o bien están involucrados en el deterioro de alimentos.

También se caracterizó la actividad antioxidante de los extractos de piel y de semilla de mango de estas tres variedades, obtenidos en las condiciones de extracción optimizadas.

Finalmente se hizo un estudio estadístico multivariante con el objeto de correlacionar el contenido en compuestos fenólicos de los diferentes extractos y materiales vegetales con su capacidad antifúngica y su capacidad antioxidante.

VI. La identificación de los compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de piel y semilla de tres variedades de mango.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de obtención de extractos, a partir de la piel y de la semilla de mango, es fundamental identificar los compuestos responsables de dicha actividad. Para ello se estudiaron los perfiles fenólicos de tres variedades de mango cultivadas en Canarias

(“Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”), lo que permitió evaluar si la variedad tiene un efecto determinante en la composición fenólica del biorresiduo y por tanto en la propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas de los extractos obtenidos a partir de ellos.

En la actualidad, el uso de herramientas analíticas potentes permite identificar compuestos con una gran precisión. En la piel y en la semilla de mango se han descrito numerosos compuestos bioactivos, utilizando distintas herramientas analíticas; sin embargo, este estudio es el primero en el que se realiza una caracterización más precisa de los compuestos fenólicos presentes en los biorresiduos de mango a través del uso de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a ionización por electrospray y cuadrupolo de tiempo de vuelo con espectrometría de masas (HPLC-ESI-QTOF-MS), una técnica muy potente que permite la medición de la masa exacta de los iones MS y MS/MS, que proporcionan información esencial para caracterizar las estructuras de los compuestos fenólicos (El-Aneed et al., 2009).

Finalmente se realizó un estudio estadístico multivariante en el que se evaluó la correlación entre los compuestos bioactivos identificados y el perfil fenólico que presentaban los biorresiduos de cada variedad de mango.

Siguiendo la “Resolución de 17 de enero de 2013, por la que se dispone la publicación del Reglamento de Enseñanzas Oficiales de Doctorado de la Universidad de La Laguna” (Boletín Oficial de Canarias BOC nº17, de 25 de enero de 2013), esta Tesis Doctoral se presenta en la modalidad de tesis por compendio de publicaciones recogida en el artículo 29. En base a esta normativa se incluyen en la presente memoria una introducción general, un resumen global de los objetivos de la investigación, de la metodología aplicada, de los resultados obtenidos, de la discusión de estos resultados y de las conclusiones finales así como una copia de los trabajos publicados.

Bibliografía

- Abdalla, A.E.M., Darwish, S.M., Ayad, E.H.E. & El-Hamahmy, R.M. (2007a). Egyptian mango by product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extracts and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103, 1141-1152.
- Abdalla, A.E.M., Darwish, S.M., Ayad, E.H.E. & El-Hamahmy, R.M. (2007b). Egyptian mango by product 1: Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103, 1134-1140.
- Aguilera, Y., Estrella, I., Benitez, V., Esteban, R.M. & Martín-Cabrejas, M. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44, 774-780.
- Ajila, C.M., Bhat, S.G. & Prasada-Rao, U.J.S. (2007a). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102, 1006-1011.
- Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G. & Prasada-Rao, U.J.S. (2007b). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105, 982-988.
- Ajila, C.M., Leelavathi, K. & Prasada-Rao, U.J.S. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48, 319-326.
- Ajila, C.M., Aalami, M., Leelavathi, K. & Prasada-Rao, U.J.S. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 219-224.
- Ajila, C.M. & Prasada-Rao, U.J.S. (2013). Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of functional foods*, 5, 444-450.
- Arogba, S.S. (1999). The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour in a model food system. *Bioresource Technology*, 70, 277-281.

- ASAJA, Asociación Agraria de Jóvenes Agricultores. (2012). Balance Agrario de Málaga 2012. <http://www.asajamalaga.com/index.php?c=1&b=MANGO&p=5&n=773>.
Último acceso: Mayo 2013.
- Ashoush, I.S., El-Batawy, O.I. & El-Shourbagy, G.A. (2013). Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Science*, 58, 27-32.
- Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J.A., Wasim Siddiqui, M.D., Dávila-Aviña, J.E. & González-Aguilar, G.A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit by-products as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866-1874.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.
- 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, 191-203.
- Barreto, J.C., Trevisan, M.T.S., Hull, W.E., Erben, G., de Brito, E.S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalder, B. & Owen R.W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5599-5610.
- Berardini, N., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2208-2216.

- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. & Schieber, A. (2005a). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5), 1563-1570.
- Berardini, N., Knödler, M., Schieber, A. & Carle, R. (2005b). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 442-452.
- Cheok, C.Y., Chin, N.L., Yusof, Y.A. & Law, C.L. (2012). Extraction of Total Phenolic Content from *Garcinia mangostana* Linn. hull. I. Effects of solvents and UV-Vis spectrophotometer absorbance method. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2928-2933.
- Comisión de las Comunidades Europeas. (2005). Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo y al Comité Económico y Social Europeo de las Regiones: Un paso adelante en el consumo sostenible de recursos: estrategia temática sobre prevención y reciclado de residuos. COM 666. Bruselas, Bélgica.
- Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias. (2010). *Estadística Agraria de Canarias 2010*. http://www.gobiernodecanarias.org/istac/temas_estadisticos/sectorprimario/agricultura/agricultura/ Último acceso: Mayo 2013.
- Consejo de la Unión Europea. (1988). Directiva Comunitaria 88/344/CEE de 13 de junio sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. DOCE, L.157/28. Bruselas, Bélgica.
- Consejo de la Unión Europea. (1992). Directiva Comunitaria 92/115/CEE de 17 de diciembre por la que se modifica por primera vez la Directiva 88/344/CEE sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. DOCE, L.409/31. Bruselas, Bélgica.

- Consejo de la Unión Europea. (1999). Directiva Comunitaria 1999/31/CEE de 26 de abril sobre el vertido de residuos. DOCE, L.182/1. Bruselas, Bélgica.
- De Moraes-Barros, H.R., De Castro Ferreira, T.A.P. & Genovese, M.I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134, 1892–1898.
- Desai, M., Parikh, J. & Parikh, P.A. (2010). Extraction of natural products using microwaves as a heat source. *Separation and Purification Reviews*, 39, 1-32.
- El-Aneed, A., Cohen, A. & Banou, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44, 210-230.
- Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y.Y., Carle, R., Gänzle, M.G. & Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7712-7718.
- Engels, C., Gänzle, M.G. & Schieber, A. (2010). Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high-speed counter-current chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 775-780.
- Engels, C., Schieber, A. & Gänzle, M.G. (2011). Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2215-2223.
- FAO. (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org> Último acceso: Mayo 2013.
- Fawole, O.A., Makunga, N.P. & Opara, U.L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 200-211.

- Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J.M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. & Pérez-Alvarez, J.A. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 176-185.
- Fernández-Ponce, M.T., Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M. & Martínez de la Ossa E. (2012). Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *Journal of Supercritical Fluids*, 72, 168-175.
- Galán-Saúco, V. (2009). *El cultivo del mango*. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 340.
- Galanakis, C.M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 68-87.
- García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E.M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. & Moreno-Rivas, M.V. (2012). Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control*, 28, 212-219.
- Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaou, N. & Mihoubi, N.B. (2012). Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Industrial Crops and Products*, 40, 167-177.
- Gil-Chávez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, J.B., Sepulveda, D., Yahia, E.M. & González-Aguilar, G.A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 5-23.
- González, M. & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2, 1842-1866.

- González-Montelongo, R., Lobo, M.G. & González, M. (2010a). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, 71, 347-355.
- González-Montelongo, R., Lobo, M.G. & González, M. (2010b). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119, 1030-1039.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 125-126.
- Iacovidou, E., Ohandja, D.G. & Voulvoulis, N. (2012). Food waste co-digestion with sewage sludge - Realising its potential in the UK. *Journal of Environmental Management*, 112, 267-274.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Ismail, T., Sestili, P. & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 397-405.
- Jiang, L.Y., Heb, S., Pan, Y.J. & Sun, C.R. (2010). Bioassay-guided isolation and EPR-assisted antioxidant evaluation of two valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 119, 1285-1292.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y. & Dosako S. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry*, 71, 61-66.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A. & Roberts, T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.

- Kim, H., Moon, J.Y., Kim, H., Lee, D.S., Cho, M., Choi, H.K., Kim, Y.S., Mosaddik, A. & Cho, S.K. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry*, 121, 429-436.
- Kim, H., Kim, H., Mosaddik, A., Gyawali, R., Ahn, K.S. & Cho, S.K. (2012). Induction of apoptosis by ethanolic extract of mango peel and comparative analysis of the chemical constituents of mango peel and flesh. *Food Chemistry*, 133, 416-422.
- Lapornik, B., Prosek, M. & Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Larrauri, J.A. & Cerezal, P. (1993). Caracterización de los residuos de diferentes variedades de mango. *Alimentaria*, 242, 89-92.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P., Borroto, B. & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as new tropical fibre: preparation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 29, 729-733.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P. & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1390-1393.
- Larrosa, M., Llorach, R., Espín, J.C. & Tomás-Barberán, F.A. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproducts extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 35, 532-542.
- Li, Y., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M. & Taylor, D.K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 570-576.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A. & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 47, 1-11.

- Lima, R.L.S., Severino, L.S., Sampaio, L.R., Sofiattib, V., Gomes, J.A. & Beltrão, N.E.M. (2011). Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Industrial Crops and Products*, 33, 364-368.
- Maisuthisakul, P. & Gordon, M.H. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*, 117, 332-341.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J. & Narbad A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia Risso*) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2056-2064.
- Meneses, N.G.T., Martins, S., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152-158.
- Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O. & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130, 986-993.
- Montgomery, D.C. (1991). *Design and analysis of experiments*. Wiley, Nueva York, EE.UU.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J. y Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Mrad, N.D., Boudhrioua, N., Kechaou, N., Courtois, F. & Bonazzi, C. (2012). Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 433-441.
- Naczka, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.

- Nithitanakool, S., Pithayanukul, P., Bavovada, R. & Saparpakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules*, 14, 257-265.
- O'Shea, N., Arendt, E.K. & Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 1-10.
- Omena, C.M.B., Valentim, I.B., Guedes, G.S. & Rabelo, A.L. (2012). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International*, 49, 334-344.
- Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M.A. & Peragón, J. (2010). *Polyphenol oxidase and oleuropein in olives and their changes during olive ripening*. En: Olives and olive oil in health and disease prevention. Capítulo 25, Sección I, Academic Press, San Diego, EE.UU., 233-238.
- Oishi, K., Kumagai, H. & Hirooka, H. (2011). Application of the modified feed formulation to optimize economic and environmental criteria in beef cattle fattening systems with food by-products. *Animal Feed Science and Technology*, 165, 38-50.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J. & Huang, F. (2008). Antioxidant activity of microwave assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*, 106, 1264-1270.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (1994). Directiva Comunitaria 94/52/CEE de 7 de diciembre por la que se modifica por segunda vez la Directiva 88/344/CEE sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *DOCE*, L.331/10. Bruselas, Bélgica.

- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (1997). Directiva Comunitaria 97/60/CEE de 7 de diciembre por la que se modifica por tercera vez la Directiva 88/344/CEE sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *DOCE*, L.331/7. Bruselas, Bélgica.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2008). Directiva Comunitaria 2008/98/CEE de 19 de noviembre sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. *DOUE*, L.313/3. Bruselas, Bélgica.
- Pérez-Serradilla, J.A. & Luque de Castro, M.D. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124, 1652-1659.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. & Núñez, M.J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2111-2117.
- Pothitirat, W., Chomnawang, M.T., Supabphol, R. & Gritsanapan, W. (2009). Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. *Fitoterapia*, 80, 442-447.
- Puravankara, D., Boghra, V. & Sharma, R.S. (2000). Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 522-526.
- Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España. (2011). Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *BOE* nº 208, 94132-94137.

- Reiss, R., Johnston, J., Tucker, K., DeSesso, J.M. & Keen, C.L. (2012). Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4421-4427.
- Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knödler M., & Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110, 620-626.
- Ribeiro, S.M.R. & Schieber, A. (2010). *Bioactive compounds in mango (Mangifera indica* L.). En: C. Actions of individual fruits in disease and cancer prevention and treatment, Capítulo 34, Academic Press, San Diego, EE.UU., 508-523.
- Routray, W. & Orsat, V. (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technology*, 5, 409-424.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product, a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303-4306.
- Sáyago-Ayerdi, S.G., Moreno-Hernández, C.L., Montalvo-González, E., García-Magaña, M.L., Mata-Montes de Oca, M., Torres, J.L. & Pérez-Jiménez, J. (2013). Mexican "Ataulfo" mango (*Mangifera indica* L.) as a source of hydrolyzable tannins. Analysis by MALDI-TOF/TOF MS. *Food Research International*, 51, 188-194.
- Schieber, A., Berardini, N. & Carle, R. (2003). Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5006-5011.
- Sogi, D.S., Bhatia, R., Garg, S.K. & Bawa, A.S. (2005). Biological evaluation of tomato waste seed meals and protein concentrate. *Food Chemistry*, 89, 53-56.

- Solís-Fuentes, J.A. & Durán-de-Bazúa, M.C. (2004). Mango seed uses: thermal behaviour of mango seed almond fat and its mixtures with cocoa butter. *Bioresource Technology*, 92, 71-78.
- Soong, Y.Y. & Barlow, P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88, 411-417.
- Soong, Y.Y. & Barlow, P.J. (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, 524-530.
- Souto de Oliveira, S.M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Junior, J.P., De Carvalho Costa, M.J. & De Melo Diniz, M.F.F. (2011). Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extract of mango (*Mangifera indica*) peel. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21, 190-193.
- Spigno, G., Tramelli, L. & De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208.
- Sun, Y., Liao, X., Wang, Z., Hu, X. & Chen, F. (2007). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 225, 511-523.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E. & Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16-23.
- Unión Europea. (2010). *Libro Verde sobre la gestión de los biorresiduos en la Unión Europea*. 2011/C 351 E/07. Bruselas, Bélgica.
- Vashisth, T., Singh, R.K. & Pegg, R.B. (2011). Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1649-1657.

- Veberic, R., Jurhar, J., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F. & Schmitze, V. (2010). Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, 119, 477-483.
- Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedoa, E., Tovar, J., Ruales, J. & Bello-Pérez, L.A. (2007). Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 722-729.
- Wijekoon, M.M., Bhat, R. & Karim, A.A. (2011). Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 615-619.
- Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K. & Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46, 505-513.
- Wolfe, K.L. & Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676-1683.
- Wootton-Beard, P.C. & Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44, 3135-3148.
- Xu, G.H., Chen, J.C., Liu, D.H., Zhang, Y.H., Jiang, P. & YE, X.Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, 73, C11-C18.
- Yang, B., Jiang, Y., Shi, J., Chen, F. & Ashraf, M. (2011). Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit - A review. *Food Research International*, 44, 1837-1842.

Yang, N. & Li, W.H. (2013). Mango peel extract mediated novel route for synthesis of silver nanoparticles and antibacterial application of silver nanoparticles loaded onto non-woven fabrics. *Industrial Crops and Products*, 48, 81-88.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es evaluar el potencial de la piel y de la semilla de mango, como materiales vegetales con capacidad antioxidante y/o antimicrobiana, para su posible utilización por la industria agroalimentaria como ingredientes en alimentos funcionales o en alimentos fortificados o como sustitutos de aditivos alimentarios sintéticos. Se estudió, fundamentalmente, el proceso de extracción como parte esencial en la obtención de extractos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana y la identificación de los compuestos relacionados con dicha actividad.

La presente Tesis Doctoral se presenta bajo la modalidad de compendio de publicaciones, por lo que se estructura en base a cuatro publicaciones científicas en las que se describen los procesos de estabilización del material vegetal y la optimización del proceso de extracción para la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante a partir de la piel y de la semilla de mango. Así mismo, se incluyen los resultados de la actividad antimicrobiana que presentan los extractos anteriormente mencionados y la identificación de los compuestos polifenólicos en éstos. Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral se desglosan a continuación, indicando entre paréntesis el/las publicaciones donde se aborda cada objetivo (Figura 1):

- Estudio del efecto de diferentes métodos de estabilización por deshidratación del material vegetal sobre la capacidad antioxidante de extractos obtenidos a partir de la piel y de la semilla de mango (publicación I).
- Elección del disolvente y temperatura de extracción adecuados para la obtención de extractos con elevada capacidad antioxidante (publicación II).
- Evaluación de otros factores implicados en el proceso de extracción que afectan a la capacidad antioxidante y al contenido en compuestos fitoquímicos de los extractos obtenidos a partir de la piel y de la semilla de mango: técnica de extracción, disolvente, tiempo de extracción, número de

pasos del proceso de extracción y relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente ([publicaciones III, IV](#)).

- Evaluación de los extractos obtenidos a partir de la piel y de la semilla de tres variedades de mango tanto por su actividad antioxidante como por su efecto sobre distintos microorganismos patógenos humanos y otros relacionados con el deterioro de algunos alimentos ([artículo V](#)).
- Identificación de los compuestos fitoquímicos presentes en los extractos de la piel y de la semilla de tres variedades de mango obtenidos en las condiciones de extracción previamente optimizadas ([artículo VI](#)).

En la [Figura 1](#) se presenta un esquema general del contenido de la presente Tesis Doctoral en el que se muestra cada uno de los objetivos abordados junto con las publicaciones y los artículos fruto de la misma.

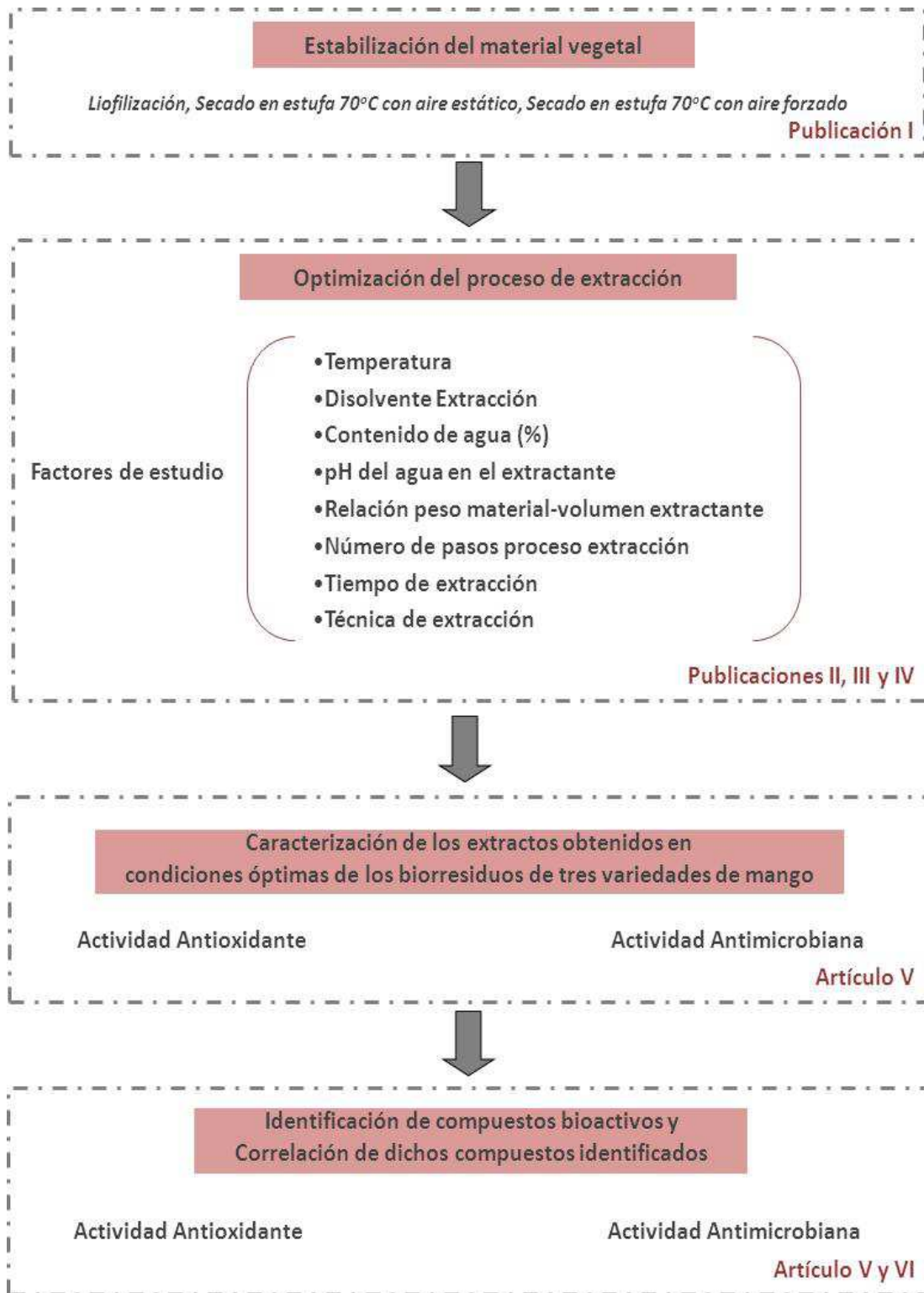


Figura 1. Esquema general de los objetivos de la Tesis Doctoral así como de las publicaciones y los artículos fruto de la misma

Material y Métodos

Material y Métodos

1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral fue piel y semilla de mango (*Mangifera indica* L.). Los frutos se recolectaron en las fincas experimentales del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) en Tenerife (Islas Canarias, España). Se seleccionaron tres variedades de mango “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3” por sus diferentes características en cuanto a color de la piel, época de maduración, primitividad de la especie y tipo de semilla. La variedad “Keitt”, con origen en Florida (Torres et al., 1997), se eligió por ser una variedad ampliamente conocida a nivel mundial y, además, porque presenta muy buena aptitud al procesado mínimo (Hernández et al., 2005). Se consideró interesante el estudio de la variedad “Sensation”, con origen en Florida (Torres et al., 1997), por su piel de color púrpura intenso relacionado con el contenido en antocianos. Asimismo se seleccionó una variedad local de las Islas Canarias (Torres et al., 1997), “Gomera 3”, para determinar la importancia de la primitividad de la especie frente a las otras variedades que fueron introducidas por su valor comercial. La variedad “Gomera 3” parece ser la misma que el patrón “Terpentine” de Florida. Desde el punto de vista de la maduración se seleccionó una variedad muy temprana (“Gomera 3”), una variedad con época de maduración media (“Sensation”) y una variedad tardía (“Keitt”). Además destacar que la semilla de dos de las variedades escogidas es monoembriónica (“Sensation” y “Keitt”) y una es poliembriónica (“Gomera 3”).

En los estudios realizados para la estabilización del material vegetal ([publicación I](#)) y para la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante ([publicaciones II, III, IV](#)) se utilizó la variedad “Keitt”. En los estudios de evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos ([artículo V](#)) y de identificación de los compuestos responsables de las actividades antioxidante y/o antimicrobiana ([artículo VI](#)) se emplearon extractos de las tres variedades obtenidos en las condiciones de extracción previamente optimizadas ([publicaciones II, III, IV](#)).

2. Maduración de la fruta y caracterización de la misma

La fruta se recolectó en estado de madurez fisiológica y se almacenó en cámaras de conservación a 18 °C con una humedad relativa del 90%, hasta que alcanzó el punto de consumo.

El mango es un fruto climatérico y por lo tanto los compuestos fitoquímicos responsables de la actividad antioxidante y/o antimicrobiana que presentan la piel y la semilla varían en función del estado de madurez del fruto. En esta Tesis Doctoral se caracterizó el punto de consumo evaluando en 21 frutos (n=21) el color de la piel y de la pulpa, la dureza del fruto, la firmeza de la pulpa, el contenido en sólidos solubles totales (SST), el pH y la acidez titulable. Además se caracterizó la morfología del mango mediante la longitud, diámetro y anchura del fruto (Torres et al., 1997) y el peso del mismo.

El color de la piel se midió en tres puntos diferentes de la zona ecuatorial del fruto y en tres de la longitudinal; el de la pulpa se evaluó en tres puntos distintos de ésta. Las medidas se hicieron con un analizador triestímulo del color reflejado por las superficies, Minolta Chroma Meter CR-300 (Wheeling, EE.UU.), usando el espacio CIE 1976 L*a*b* o CIELAB, que se basa en la teoría de percepción de colores opuestos (Commission Internationale de L'Eclairage, 1986). El cabezal del instrumento (Minolta CR-300) es capaz de medir hasta una superficie de 8 mm de diámetro utilizando iluminación difusa y un ángulo de visión de 0°, el iluminante usado fue el D65. Para calibrar el colorímetro se utilizó una placa blanca de calibración (L*, 97,99; a*, -0,08; b*, +1,61). Para la caracterización del color se utilizaron los atributos cromáticos luminosidad (L*), matiz o tonalidad (ángulo hue, h°) y cromaticidad (C*). Estos dos últimos parámetros se calculan a partir de los parámetros medidos a* y b*:

$$h^{\circ} = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \cdot \left(\frac{180}{\pi}\right) \quad \text{si } a^* > 0 \text{ y } b^* \geq 0$$

$$h^{\circ} = 180 + \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \cdot \left(\frac{180}{\pi}\right) \quad \text{si } a^* < 0$$

$$h^{\circ} = 360 + \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \cdot \left(\frac{180}{\pi}\right) \quad \text{si } a^* > 0 \text{ y } b^* < 0$$

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$$

Para la evaluación de la dureza y de la textura se utilizó un durómetro Durofel (Tarascon, Francia) y un analizador de textura TA-HD-Plus Aname (Madrid, España) con una célula de carga de 250 kg, respectivamente. Para analizar la textura se utilizó la célula de cizallamiento Kramer que presenta 5 cuchillas guiadas de acero inoxidable (HPD/K55) que se acoplan a la plataforma HDP/90. El texturómetro fue configurado para llevar a cabo un ensayo de compresión, con una velocidad de pre-ensayo y ensayo de 2 mm/s y de post-ensayo de 10 mm/s.

El análisis de los SST, pH y acidez titulable se realizó en un homogeneizado de 20 g de pulpa de mango con 60 ml de agua. El contenido en SST, expresados como °Brix, se determinó por refractometría utilizando un refractómetro de mano ATAGO ATC-1 (Tokio, Japón), cuyo intervalo de medida comprende de 0-32 °Brix, con una escala de 0,2 ° Brix de división mínima. El pH se midió con un pH-metro WTW 523 (St Woburn, EE.UU.); para ello 20 ml del homogeneizado de fruta se llevó a ebullición, manteniéndolo en agitación, para eliminar el dióxido de carbono disuelto que puede interferir en la determinación de la acidez de la muestra. La muestra se dejó enfriar y la medida de pH se realizó a temperatura ambiente. La acidez titulable se determinó mediante valoración con una disolución estándar de hidróxido sódico 0,1 N (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta un pH de 8,1. Los resultados se expresaron como mg de ácido cítrico/100 g de fruta (AOAC International, 1990).

Las medidas de longitud y espesor se tomaron como indican Torres et al. (1997). A partir de la medida longitudinal y del diámetro se calculó la relación longitud/diámetro. Para pesar la fruta se utilizó una balanza Denver Instrument Company modelo AL-1800 (Colorado, EE.UU.) de sensibilidad hasta 0,01 g y precisión de 0,001 g.

En la [Tabla 1](#) aparece un resumen de las características fisicoquímicas de las tres variedades de mango estudiadas en la presente Tesis Doctoral en el momento en el que se separaron la piel y la semilla.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las tres variedades de mango (“Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”) en el estado de madurez de consumo

Parámetros	“Keitt”	“Sensation”	“Gomera 3”
Color de la piel*			
L*	63 ± 9 ^a	64 ± 6 ^a	56 ± 5 ^b
h°	168 ± 14 ^a	91 ± 11 ^b	93 ± 11 ^b
C*	38 ± 4 ^b	40 ± 9 ^b	44 ± 6 ^a
Color de la pulpa*			
L*	86 ± 4 ^b	90 ± 5 ^a	59 ± 4 ^c
h°	91 ± 6 ^a	88 ± 2 ^b	85 ± 2 ^b
C*	83 ± 2 ^a	86 ± 3 ^a	60 ± 7 ^b
Dureza del fruto (°Durofel)	70 ± 9 ^c	81 ± 14 ^a	75 ± 10 ^b
Firmeza de la pulpa (N)	60 ± 18 ^b	128 ± 12 ^a	140 ± 19 ^a
pH	4,8 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,1 ^{ab}	4,5 ± 0,1 ^b
Sólidos Solubles Totales (°Brix)	20 ± 2 ^a	17 ± 4 ^{ab}	16 ± 3 ^b
Acidez titulable (mg ácido cítrico/100 g)	176 ± 26 ^a	171 ± 42 ^{ab}	173 ± 42 ^b

* Los valores son la media ± desviación estándar (n = 21). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,050$) entre las variedades. L*, luminosidad; h°, ángulo hue; C*, cromaticidad

3. Obtención y estabilización del material vegetal: piel y semilla de mango

Una vez caracterizada la fruta, la piel y la semilla de mango se separaron de la pulpa manualmente y se congelaron (cada una por separado) en nitrógeno líquido. La piel resultó ser el 31 ± 1% del peso total del fruto mientras que la semilla fue del 4,2 ± 2,1%. El material vegetal se conservó en botes estériles a -80 °C para disminuir la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de compuestos responsables de la actividad antioxidante y/o antimicrobiana.

En primer lugar se evaluó cuál era el mejor tratamiento para la estabilización del material vegetal ([publicación I](#)); para ello, la piel y la semilla se sometieron a distintos tratamientos de deshidratación: i) liofilización a 50 mPa y -40 °C en un

liofilizador Cristo alpha-1-4 LSC (Osterode, Alemania) durante cinco días; ii) secado en estufa P-selecta serie 2000 (Barcelona, España) a 70 °C con aire estático durante 24h; iii) secado en estufa P-Selecta S-374 (Barcelona, España) a 70 °C con aire forzado durante 24h. Como control se utilizó material sin deshidratar conservado a -80 °C hasta su análisis. En cada uno de los tratamientos se determinó el porcentaje de agua eliminada durante la deshidratación, pesando el material vegetal antes y después del proceso de deshidratación.

El material vegetal deshidratado y el no deshidratado (control) se molieron utilizando un molinillo eléctrico (IKA A11 basic, Staufen, Alemania). Se determinó el color del material vegetal colocando aproximadamente 7 g en un vaso de precipitado de 100 ml y tomando tres medidas de color a través del fondo del vaso con un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-300, Wheeling, EE.UU.). Se realizó una caracterización granulométrica de los materiales deshidratados según los diferentes métodos de estudio, así como también del material no deshidratado. Dicha caracterización consistió en la utilización de una serie de tamices con diferentes diámetros (2,8; 1,4; 1,0; 0,71; 0,5; 0,355; 0,25; 0,15 y 0,05 mm) colocados en columna y sometidos a vibración y movimientos rotatorios intensos en un tamizador (Mecánica Científica 105611, Madrid, España). Después de 15 min, los tamices se desensamblaron, y se tomó el peso de material retenido en cada uno de ellos. Los valores de caracterización granulométrica para piel fueron 39% > 500 µm, 12% entre 355 y 500 µm, y 49% < 355 µm; y para semilla fueron 48% > 500 µm, 9% entre 355 y 500 µm y 43% < 355 µm. Las muestras deshidratadas y molidas se conservaron a -20 °C y las que no se sometieron a deshidratación a -80 °C, hasta su extracción.

4. Obtención de extractos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana

Se utilizaron dos sistemas de extracción para obtener los extractos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de la piel y de la semilla de mango. La extracción tradicional (*Traditional Extraction*, TE) con disolventes se empleó para la optimización del disolvente y de la temperatura de extracción

(publicación II). También se utilizó para la evaluación de otros factores que intervienen en el proceso de extracción, como el número de etapas de extracción, el tiempo, el porcentaje de agua y el pH de la misma en el extractante y la relación peso de material vegetal:volumen de extractante (publicaciones III y IV), donde además se comparó dicha técnica de extracción con otra técnica: extracción asistida por microondas (*Microwave-Assisted-Extraction*, MAE) (publicaciones I, III y IV). La TE se llevó a cabo en tubos sellados herméticamente y cubiertos con papel de aluminio para evitar las pérdidas de disolvente por evaporación y de compuestos bioactivos por acción de la luz. Dichos tubos se incubaron en baños termostáticos (Grant Instruments Y38, Cambridge, Reino Unido) a las distintas temperaturas evaluadas. La MAE se llevó a cabo usando un microondas (Milestone ETHOS 1 MW, Sorisole, Italia) en recipientes de teflón cerrados. La temperatura en el microondas se controló continuamente en todos los recipientes de extracción. El sistema incluye dos dispositivos de control de la temperatura; uno de ellos es un elemento de control directo mediante una fibra óptica de zafiro (ATC-FO sensor, MLS GmbH, Leutkirch, Alemania) que se inserta en uno de los recipientes de extracción, y el otro es un sensor de infrarrojos de alta sensibilidad; ambos dispositivos están controlados por un microprocesador.

El proceso general realizado para llevar a cabo la extracción de la piel o de la semilla de mango consistió en la mezcla de distintas proporciones (variable en cada experimento del proceso de optimización) del material vegetal con el extractante, consistente en agua, un disolvente orgánico o mezclas de agua y el disolvente orgánico en diferentes proporciones según el diseño experimental. En todos los casos se usó agua desionizada (resistividad, 18,2 M Ω cm) obtenida con un sistema milli-Q (Millipore, Bedford, EE.UU.); los disolventes empleados (metanol, acetona, etanol) se obtuvieron de Scharlau Chemie (Barcelona, España). El material vegetal se mezcló con el extractante utilizando un homogeneizador Politron PT-6000, (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) a alta velocidad (1250 rad/s) durante 1 min. La extracción (entre uno y tres procesos independientes) se llevó a cabo a distintas temperaturas y tiempos (que fueron optimizados durante la Tesis Doctoral) por inmersión en un baño de agua (TE) o usando un microondas (MAE). Posteriormente,

los extractos se centrifugaron a 525 rad/s durante 20 min en una centrífuga Jouan CR-312 (Thermo Electron Corporation, Madrid, España). Los sobrenadantes obtenidos en las distintas etapas de extracción se mezclaron y se conservaron a -80 °C protegidos de la luz hasta su análisis (menos de tres días).

Cada proceso de extracción evaluado se hizo, al menos, por triplicado.

5. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos

Para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron distintos métodos cuyo objetivo es evaluar los diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes frente a la peroxidación lipídica o al atrapamiento de radicales libres (publicaciones I, II, III y IV y artículo V).

Todas las medidas de actividad antioxidante se hicieron en un espectrofotómetro UV-visible de doble-haz 160A de Shimadzu (Kioto, Japón). Como control, para cada una de las metodologías utilizadas, se usó el disolvente usado en la extracción sin extracto.

5.1. Determinación de la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica

5.1.1. Ensayo del blanqueamiento del β -caroteno

El método del blanqueamiento del β -caroteno se basa en la capacidad de los antioxidantes de disminuir la oxidación del ácido linoleico. Inicialmente se forma la emulsión β -caroteno/ácido linoleico que consiste en un sistema formado por 40 mg de β -caroteno (Aldrich, Madrid, España), 200 mg de ácido linoleico (Sigma, Madrid, España) y 2 g de Tween 40 (Sigma) en 10 ml de cloroformo (Scharlau Chemie). Un mililitro de esta emulsión se distribuye en tubos individuales y se eliminan todos los restos de disolvente orgánico mediante evaporación (evaporador Heto VR-1, Allerod, Dinamarca) a 40 °C durante 24h. A continuación, el residuo obtenido se redissuelve con 6 ml de agua mili-Q y se almacena a 5 °C hasta su utilización (no más de cinco días). En el momento de realizar el ensayo, se agrega a cada tubo 50 ml de agua, que había sido previamente oxigenada mediante el burbujeo de aire en ella durante 60 min a temperatura ambiente, y la mezcla se agita vigorosamente.

Seguidamente se mide la absorbancia de la emulsión a 470 nm. A 1,5 ml de la emulsión β -caroteno/ácido linoleico se agrega 75 μ l del extracto (o del control). Para inducir la autooxidación, los tubos se colocan en un bloque calefactor VWR (Barcelona, España) a 50 °C durante 210 min. A continuación, los tubos se enfrían y se mide la extensión de la decoloración del β -caroteno a 470 nm (Miller, 1971). La actividad antioxidante del extracto se expresó como coeficiente de actividad antioxidante (*Antioxidant Activity Coefficient*, AAC), definido como la relación entre la decoloración del β -caroteno que tiene lugar en presencia y ausencia del extracto:

$$AAC = \left(\frac{A_t - A_t^0}{A_0^0 - A_t^0} \right) \cdot 1000$$

siendo A_t y A_t^0 la absorbancia después de la incubación a 50 °C durante 210 min del extracto y del control, respectivamente, y A_0^0 la absorbancia del control medido a tiempo inicial.

La repetibilidad del procedimiento, expresada como desviación estándar relativa fue < 5%.

5.1.2. Ensayo de las sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método se basa en la peroxidación de una emulsión de fosfatidilcolina [25 μ l de 50 mg/ml de fosfatidilcolina (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania) en 1,5:1 (v:v) cloroformo:etanol] (González-Paramás et al., 2004), inducida por 200 μ l de 1 mM de cloruro férrico (Sigma) contenido en 300 mM de cloruro potásico (Merck) y en presencia del extracto o del control (50 μ l). La peroxidación comienza cuando se añade ácido ascórbico (Sigma) (125 μ l a 0,16 mM) y se incuba la mezcla a 37 °C durante 24h. Para parar la reacción se añaden 0,75 ml de una mezcla 1,5:1 (v:v) de 9,4% ácido tricloroacético (Panreac, Barcelona, España) en 0,47 N de ácido clorhídrico (Merck) (a pH = 1,5) con 1% ácido tiobarbitúrico (Sigma) y 50 μ l de butil hidroxitolueno (Merck) (760 mg/l en etanol). La mezcla se incuba a 95 °C durante 60

min en un bloque calefactor VWR. Después, se enfría y centrifuga a 1.257 rad/s durante 2 min en una microcentrífuga Sorvall MC-12V (Dupont, Newtown, EE.UU.) para eliminar las posibles proteínas precipitadas. Por último, la intensidad del color del TBARS se mide a 535 nm. La actividad antioxidante se expresó mediante el porcentaje de inhibición (*Inhibition Ratio*, IP %), calculado como:

$$IP [\%] = \left(1 - \frac{A_t}{A_t^0} \right) \cdot 100$$

donde A_t es la absorbancia medida en la muestra y A_t^0 es la absorbancia del control totalmente oxidado.

La repetibilidad del procedimiento fue buena, siempre < 10%.

5.2. Determinación de la capacidad del extracto para atrapar radicales libres

5.2.1. Test del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•])

La capacidad de atrapamiento del radical libre DPPH[•] (Sigma) se determinó mediante una versión ligeramente modificada del método desarrollado por Brand-Williams et al. (1995). El método consiste en la mezcla de 1 ml de una disolución metanólica que contiene el radical libre DPPH[•] (absorbancia alrededor de 1,000 a 515 nm) con 25 µl del extracto obtenido a partir de la piel o de la semilla de mango o del control. Tras agitar la mezcla, se deja reposar 15 min hasta que la reacción se completa y su absorbancia se mide espectrofotométricamente a 515 nm.

5.2.2. Test del 2,2-azino-bis-(ácido 3-etilbenztiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+})

La capacidad de atrapamiento del radical libre ABTS^{•+} se evaluó por medio de una versión ligeramente modificada del método descrito por Arnao et al. (2001). En primer lugar, se forma el radical catiónico ABTS^{•+} en una disolución de tampón fosfato sódico (Merck) 50 mM de pH = 7,5, con 0,25 µM de enzima peroxidasa de rábano tipo VI [$RZ (A_{403 \text{ nm}}/A_{275 \text{ nm}}) = 2,8$] (Sigma), 2 mM de ABTS (Sigma) y 45 µM de peróxido de hidrógeno (Sigma) en un volumen total de 1 ml. La formación del

radical se lleva a cabo a 25 °C en un baño de agua P-Selecta S-138 durante aproximadamente 15 min (tiempo que tarda en estabilizarse su absorbancia \approx 1,200). La formación del radical antes de la adición del extracto o del control previene la interferencia de compuestos que estuvieran contenidos en ellos que pueden afectar a la formación del mismo (van den Berg et al., 1999). A continuación, se toma 1 ml del radical ABTS^{•+} y se le añade 50 μ l de extracto o del control; se mide su inhibición antioxidante a 730 nm después de 6 min de reacción.

En ambos métodos (DPPH[•] y ABTS^{•+}) la actividad antioxidante medida se expresó como:

- a) Gramos de TEAC o TE (actividad antioxidante equivalente al trolox, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) por cada 100 g de piel o de semilla de mango deshidratada (MS). El trolox (Sigma) fue usado como estándar al ser un análogo estructural del α -tocoferol soluble en agua.
- b) Gramos de AEAC o AE (actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico, *Ascorbic Equivalent Antioxidant Capacity*) por cada 100 g de piel o de semilla de mango deshidratada (MS). En este caso se usó como estándar ácido ascórbico.

Para ambos métodos (DPPH[•] y ABTS^{•+}), se construyeron curvas de calibrado ($R^2 > 0,940$) con cada uno de los disolventes evaluados, utilizando las absorbancias obtenidas a siete concentraciones diferentes de Trolox y ácido ascórbico comprendidas entre 50-500 mg/l y 25-250 mg/l, respectivamente. Cada una de las concentraciones se ensayó por triplicado. La repetibilidad del procedimiento, expresada como desviación estándar relativa, fue $< 5\%$.

6. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos

Se determinó la actividad antimicrobiana de diferentes extractos obtenidos a partir de la piel y de la semilla de las tres variedades de mango evaluadas en la presente Tesis Doctoral: “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3” ([publicación V](#)). Dichos extractos fueron obtenidos en las condiciones de extracción optimizadas previamente ([publicaciones I, II, III y IV](#)) ([Tabla 2](#)).

Tabla 2. Condiciones de extracción óptimas para la obtención de extractos con alto contenido en compuestos fenólicos a partir de piel y semilla de mango, utilizando MAE

Condiciones de extracción	Piel		Semilla
	Extracción A	Extracción B	
Temperatura (°C)	75	75	50
Tiempo (min)	60	60	60
Disolvente	Etanol:agua	Etanol:agua	Acetona:agua
Proporción de disolvente en la mezcla (v:v)	50:50	50:50	50:50
pH del agua en el extractante	3	3	8
Nº de procesos de extracción	3	3	3
Relación peso de material vegetal: volumen de disolvente (w:v)	1:50	1:10	1:30

Antes de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos se eliminaron los disolventes orgánicos presentes en los mismos en un evaporador al vacío Heto VR-1 a 40 °C (etanol en los extractos de piel y acetona en los extractos de semilla).

La actividad antifúngica de los extractos se evaluó frente a 18 especies de levaduras: *Candida bracarensis* (CECT 12000), *C. glabrata* (ATCC 36583), *C. nivariensis* (CBS 9983), *C. parapsilopsis* (ATCC 22019), *Dekkera anomala* (ATCC 58985), *D. bruxellensis* (ATCC 36234), *Hanseniaspora uvarum* (CECT 11105), *Lodderomyces elongisporus* (ATCC 11503), *Metschnikowia pulcherrima* (CECT 11602), *Pichia fermentans* (ATCC 10651), *P. kluyveri* (CECT 11023), *P. ohmeri* (ATCC 46053), *Schizosaccharomyces japonicus* (ATCC 10660), *Sacharomycodes ludwigii* (ATCC 11313), *Zygosaccharomyces bailii* (CECT 11997), *Z. bisporus* (ATCC 52405), *Z. microellipsoides* (ATCC 10605) y *Z. rouxii* (ATCC 2623). Las levaduras empleadas se obtuvieron de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC; Manassas, EE.UU.), de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España) o de la colección holandesa de hongos (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, CBS; Utrecht, Holanda). Todas las levaduras fueron cultivadas por separado en agar extracto de levadura-peptona-glucosa (YPD) [5 g/l extracto de levadura (Pronadisa, Madrid, España), 3 g/l peptona (Panreac), 20 g/l dextrosa (VWR BDH Prolabo, Barcelona, España), a una temperatura de 28 °C

durante 24-48h para asegurar condiciones óptimas de crecimiento y pureza. Posteriormente, se conservaron en glicerol:agua (30:70, p:v) a -80 °C hasta su utilización.

La actividad antifúngica de los extractos de mango obtenidos en las condiciones óptimas (Tabla 2) fue determinada utilizando dos tipos de ensayos diferentes: difusión en agar y micro-dilución.

6.1. Ensayo de difusión en agar

Cada cepa de levadura se cultiva en YPD líquido a 28 °C hasta alcanzar una absorbancia de 1,000 a una longitud de onda de 600 nm (A_{600}). Posteriormente, 3,33 ml de este cultivo se mezcla con 100 ml de YPD agar al 1% fundido a 50 °C y la mezcla se vierte en placas de Petri de 90 mm de diámetro. A continuación, se realizan orificios de 8 mm de diámetro en el medio de cultivo y en cada uno de ellos se incorporan 60 µl de cada extracto de piel o semilla de mango a evaluar. Las placas se pre-incuban a 4 °C durante 2h para facilitar la difusión de los compuestos antifúngicos y evitar el crecimiento de los microorganismos, y posteriormente se incuban a 28 °C durante 24-48h para favorecer el crecimiento de los microorganismos. Transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición (mm). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

6.2. Ensayo de micro-dilución

La Concentración Mínima Inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC), o la concentración de extracto más baja que produce la inhibición del crecimiento de las levaduras, se determinó mediante el ensayo de micro-dilución en los extractos que dieron positivos (el extracto del biorresiduo es capaz de inhibir en cierto grado el crecimiento microbiano) frente a levaduras en el ensayo de difusión en agar.

Los extractos se resuspendieron a una concentración entre 0,1-30 mg equivalentes de ácido gálico (*gallic acid equivalents*, GAEs) por ml con agua milli-Q estéril. Las MICs de los extractos se determinaron por el método de diluciones seriadas en microplacas de 96 pocillos estériles. Cada cepa de levadura se lleva a

fase de crecimiento exponencial ($A_{600} = 0,500$) en medio YPD líquido con agitación a 28 °C. La suspensión celular se diluye en YPD estéril concentrado (3X) a una absorbancia de 0,100 (A_{600}). A continuación, en cada uno de los pocillos, se colocan 44 μ l de la suspensión celular ($A_{600} = 0,100$) y se les añade 66 μ l del extracto de mango a evaluar. De esta forma, el inóculo final contiene aproximadamente 2×10^5 UFC por ml en un volumen final de 110 μ l. Paralelamente, en cada microplaca se realiza un control positivo (con levaduras y sin extracto) y un control negativo (con extractos y sin levadura). Las microplacas se incuban en condiciones aeróbicas a 28 °C durante 24-48h, y posteriormente se examinan visualmente y por espectrofotometría. Las determinaciones visuales se realizan en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61, Tokio, Japón) mientras que las determinaciones espectrofotométricas se llevan a cabo usando un lector automático de microplacas (MTX Lab Sysytem, Virginia, EE.UU.) a una longitud de onda de 600 nm. En la lectura espectrofotométrica, la prueba se consideró negativa (no hay efecto del extracto) cuando el crecimiento de la levadura fue menor a un 90% con respecto al control positivo (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Por otro lado, se determinó la Concentración Mínima Fungicida (*Minimum Fungicidal Concentration*, MFC), o concentración más baja donde no se observa crecimiento (visualmente y por espectrofotometría), mediante un sub-cultivo realizado en una segunda microplaca. En este caso, se coloca 90 μ l de medio YPD líquido fresco y 10 μ l de medio con extracto de los contenidos en cada pocillo de la microplaca donde se determina la MIC. Esta segunda microplaca, se incuba a 28 °C durante 24-48h.

Cada muestra fue evaluada por triplicado en dos experimentos independientes tanto en la determinación de la MIC como de la MFC.

7. Rendimiento de la extracción

El disolvente de extracción de los diferentes extractos obtenidos fue evaporado a sequedad (Heto VR-1) a 40 °C. El rendimiento del extracto se definió como la cantidad de extracto seco (g) obtenido por cada 100 g de piel y de semilla deshidratada de mango (Llorach et al., 2002).

8. Cuantificación de compuestos bioactivos

Para la cuantificación de los compuestos bioactivos presentes en los extractos obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron distintos índices totales: fenoles, taninos, proantocianidinas, flavonoides, antocianos y clorofilas.

8.1. Fenoles totales

El contenido en compuestos fenólicos se determina mezclando 200 µl de agua milli-Q, 50 µl del extracto y 50 µl del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma). Después de 6 min, se añade 500 µl de una disolución de carbonato sódico (Sigma) al 7% a la mezcla y 500 µl de agua milli-Q y se deja a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente, se lee la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron como gramos GAEs en 100 g de piel o de semilla deshidratada (MS) de mango (González-Montelongo et al., 2010).

Se construyeron curvas de calibrado con ácido gálico (Sigma) ($R^2 = 0,904-0,998$) para cada uno de los disolventes evaluados, representando las absorbancias obtenidas para siete concentraciones (15-250 mg/l) diferentes de ácido gálico y cada una de ellas analizada por triplicado. La repetibilidad del procedimiento, medida como desviación estándar relativa, fue < 5%.

8.2. Taninos

Para determinar el contenido en taninos (FAO/IAEA, 2000) se utilizó el método Folin-Ciocalteu utilizado para determinar los fenoles totales (González-Montelongo et al., 2010) acoplado al uso de polyvinylpirrolidona (PVPP, Sigma). Los taninos precipitan cuando se añade PVPP a los extractos (PVPP:fenoles totales, 100:1 p:v), una vez que el pH de los extractos se ajusta a 3,0. En el sobrenadante se encuentran aquellos compuestos fenólicos que no son taninos, por lo tanto, el contenido en taninos será calculado por la diferencia entre el contenido en fenoles del extracto y los del sobrenadante (González & González, 2010). Los resultados se expresaron como gramos equivalentes de ácido tánico (Merck) (*tannic acid equivalents*, TAEs) por 100 g de MS de piel o semilla de mango.

Se construyeron curvas de calibrado con ácido tánico ($R^2 > 0,990$) representando las absorbancias obtenidas para siete concentraciones (0,90-25 $\mu\text{g/l}$) de ácido tánico y cada una de ellas analizada por triplicado. La repetibilidad del procedimiento, medida como desviación estándar relativa, fue $< 5\%$.

8.3. Proantocianidinas o taninos condensados

La determinación de los taninos condensados (proantocianidinas) se basó en la despolimerización de las proantocianidinas en butanol-HCl (95:5 v:v; Panreac) (disolvente:extracto, 5:1 v:v) (FAO/IAEA, 2000). Para aumentar la reproducibilidad del ensayo se añade una disolución de sulfato de amonio férrico (Merck) al 2% en ácido clorhídrico 2 N. La mezcla se incubó a 97°C durante 60 min, y posteriormente se mide la absorbancia a 550 nm. La cantidad de proantocianidinas se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{proantocianidinas (g LEs / 100 g MS)} = \left(\frac{\text{Abs}_{550} \cdot 78}{\text{MS} (\%)} \right)$$

donde Abs_{550} es la absorbancia medida en la muestra, 78 es un factor de corrección (FAO/IAEA, 2000) y MS (%) es el porcentaje de peso expresado en MS en la muestra. Los resultados se expresaron como gramos equivalentes de leucoantocianidina (*leucoanthocyanidin equivalents*, LEs) por 100 g de MS del residuo de mango.

8.4. Flavonoides totales

El contenido en flavonoides totales se determinó por un método espectrofotométrico (Thoo et al., 2010), con medida de la absorbancia a 510 nm, que se basa en la formación de complejos entre el cloruro de aluminio (VWR BDH Prolabo) y los grupos hidroxilos C-4, C-3 o C-5 de las flavononas y los flavonoles y los grupos ortodihidroxilos de los anillos A o B de los flavonoides (González & González, 2010). En la determinación se añade una disolución de nitrito de sodio (Merck) al 5% y 250 μl de agua milli-Q a 50 μl de extracto, se agita durante 1 min y posteriormente se deja reposar durante 6 min. A continuación, se añaden 30 μl de cloruro de aluminio al 10% (v:v), se agita durante 1 min, y se vuelve a dejar reposar

durante 5 min. Finalmente se añaden 100 μl de hidróxido sódico 1 M y 55 μl de agua milli-Q. Los resultados se expresaron como gramos equivalentes de catequina (Sigma) (*catechin equivalents*, CE) por 100 g de MS de biorresiduo de mango.

Se construyeron curvas de calibrado con catequina ($R^2 > 0,997$), para cada uno de los disolventes evaluados, representando las absorbancias obtenidas para siete concentraciones (7,5-35 mg/l) de catequina y cada una de ellas analizada por triplicado. La repetibilidad del procedimiento, medida como desviación estándar relativa, fue $< 5\%$.

8.5. Antocianos totales

El contenido en antocianos monoméricos en la piel y en la semilla de mango se determinó usando un método basado en las diferencias de absorción de los antocianos a distintos pHs (Lee et al., 2005). Para poder cuantificar por este método los extractos se concentraron cinco veces más respecto a su concentración inicial. Los extractos (150 μl) se mezclan con un tampón de cloruro potásico (Merck) 25 mM a pH 1,0 y se mide la absorbancia de la muestra a 510 nm después de 15 min de reacción y previo centrifugado de la misma, a 1.257 rad/s durante 5 min, en una microcentrífuga Sorvall MC-12V. El mismo volumen de extracto se hace reaccionar de igual forma pero utilizando acetato sódico (Merck) 0,4 M a pH 4,5 como tampón. La absorbancia de esta disolución se mide también a 510 nm. La concentración de antocianos monoméricos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/l)} = \left[(A_{515} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \right] \cdot \text{PM} \cdot \frac{1.000}{\epsilon \cdot l}$$

donde A es la absorbancia, PM es el peso molecular del cianidín 3-glucósido (449,2 g/mol), ϵ es el coeficiente de extinción molar del cianidín 3-glucósido (26.900 l/mol/cm) y l es la longitud del paso de luz en la celda (1 cm). Finalmente, el contenido en antocianos se expresó como mg equivalentes de cianidín 3-glucósido (*cyanidin 3-glucoside equivalents*, CE) por 100 g de MS de piel o de semilla de mango.

8.6. Clorofilas

El contenido en clorofilas se determinó usando un método basado en la determinación espectrofotométrica a dos longitudes de onda 664 y 647 nm que son los máximos de absorción de las clorofilas a y b, respectivamente (Cubas et al., 2008). La concentración de clorofilas presentes en los extractos se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Clorofila a (mg/l)} = 8,9 \cdot \text{Abs}_{664} - 1,9 \cdot \text{Abs}_{647} - 0,11$$

$$\text{Clorofila b (mg/l)} = 30 \cdot \text{Abs}_{647} - 7,1 \cdot \text{Abs}_{664} - 0,98$$

donde A_{664} y A_{647} se corresponden con los máximos de absorción de las clorofilas a y b, respectivamente. El contenido en clorofilas se expresó como μg por 100 g de MS de piel o semilla de mango.

9. Identificación de compuestos bioactivos

Los extractos obtenidos, empleando las condiciones de extracción optimizadas previamente (ver Tabla 1, sección 6; [publicaciones I, II, III y IV](#)), a partir de la piel y de la semilla de las tres variedades de mango evaluadas en esta Tesis Doctoral, se caracterizaron según su perfil polifenólico ([artículo VI](#)).

Para hacer la extracción y purificación de los compuestos fenólicos se toma 2 ml de cada extracto y se elimina el disolvente orgánico, a 40 °C, en un concentrador SpeedVac Savant SPD131DDA-RVT4104TRAP (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Posteriormente, se purifica 1 ml del extracto, sin el disolvente orgánico, con una columna que contiene 1 g de Sephadex LH-20 (Sigma), que antes de su uso se acondiciona con metanol y agua durante 20 min. A continuación, la columna se lava con 2 ml de agua desionizada para eliminar los azúcares retenidos en ella y que pudieran haber sido extraídos de la piel y de la semilla de mango. La recuperación de los compuestos fenólicos se realiza eluyendo con 4 ml de metanol y los eluatos se evaporan a sequedad al vacío en el concentrador SpeedVac Savant SPD131DDA-RVT4104TRAP. El residuo seco se redisuelve en 1 ml de metanol, se filtra (filtro de

jeringa de nylon de 13 mm x 0,45µm; Análisis Vínicos, Tomelloso, España) y se almacena a -80 °C hasta su análisis.

El análisis de los compuestos fenólicos extraídos y purificados se hizo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo tipo cuadrupolo (*High Performance Liquid Chromatography coupled to Electro-Spray Ionisation and Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry*, HPLC-ESI-QTOF-MS). Cada extracción y análisis se realizó por triplicado. La separación cromatográfica se llevó a cabo en un equipo Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) formado por una bomba cuaternaria (G1311A), un desgasificador de disolventes (G1322A), un inyector automático (G1367B), un compartimento termostatzado para la columna (G1316A) y un detector de diodos en fila (G1315B). Se utilizó una columna de fase inversa C18 Hypersil ODS (250 × 4,6 mm, 5 µm) (Teknokroma, Barcelona, España); la temperatura de separación fue de 25 °C. La fase móvil consistió en ácido fórmico (Panreac) al 1% en agua milli-Q (A) y ácido fórmico al 1% en acetonitrilo (Panreac) (B) y la separación se realizó en 70 min con el siguiente gradiente: 0 min, 100% A; 15 min, 75% A; 30 min, 70% A; 70min, 20% A; 65min, 0% A; 70min, 100% A. La columna se equilibró durante 5 min entre un análisis y otro. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min y el volumen de inyección fue 10 µl. La detección en el UV se realizó a 280, 320 y 360 nm.

Al sistema HPLC Agilent 1200 se le acopló un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo tipo cuadrupolo Agilent Accurate Mass QTOF LC-MS con fuente de ionización por electrospray (ESI) con tecnología JetStream. El espectro de masas fue configurado en modo de ionización negativa para un intervalo de masas entre 100-1.000 m/z. Como gas de colisión se utilizó nitrógeno ultra-puro y como gas de nebulización se usó nitrógeno de alta pureza. Los parámetros de configuración del equipo fueron un voltaje del capilar de 3,5 kV y de fragmentación de 100 kV. Los parámetros para la fuente de ionización fueron una presión de nitrógeno y un flujo del nebulizador de 310.266 kPa y 10 l/min, respectivamente, con temperaturas del gas de secado y del gas de flujo coaxial de 350 y 250 °C, respectivamente; el flujo del gas coaxial fue de 6 l/min y la energía de colisión MS/MS de 20 V.

Los datos de masas generados fueron procesados por el software Masshunter Data Acquisition B.04.00 (Agilent Technologies) con el que además, con la herramienta *Generate Molecular Formula* (Generador de Fórmulas Moleculares), se podía generar una lista de posibles fórmulas químicas para cada masa molecular detectada de acuerdo a su masa exacta y su patrón isotópico. Las fórmulas generadas con un alto porcentaje de *Score* presentaban mayor similitud entre la fórmula generada por el sistema y el compuesto a identificar. Por otra parte, la interpretación del espectro MS/MS en comparación con los patrones encontrados en literatura o en numerosas bases de datos online (Phenol-Explorer; ChemSpider; MassBank; Spectral Database for Organic Compounds) permitió identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos.

10. Análisis de datos

Para las distintas réplicas de un mismo tratamiento (de estabilización, de extracción, etc.) se calculó la media y la desviación estándar (Microsoft Excel 2007, Microsoft, Madrid, España).

Para la detección de datos anómalos se empleó el test de Grubbs en muestras de hasta nueve datos y el test de Box & Wisker para muestras con mayor número de datos (Statgraphics-Plus versión 5.1; Statistical Graphics, Rockville, EE.UU.).

El análisis de varianza (ANOVA), a un nivel de confianza del $p < 0,050$, se utilizó para evaluar el efecto de los distintos factores estudiados sobre la actividad antioxidante, la actividad antimicrobiana, el rendimiento de la extracción y el contenido en compuestos bioactivos [Statgraphics-Plus versión 5.1, en las [publicaciones I-IV](#); SPSS versión 19 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.), en los [artículos V y VI](#)].

El test de Fisher *Least-Significant-Difference* (LSD) o el de Tuckey se aplicaron a los resultados experimentales para estimar las diferencias significativas entre pares ($p < 0,050$) (Statgraphics-Plus versión 5.1, en las [publicaciones I-IV](#) o SPSS Inc, en el [artículo V](#)).

El estudio de correlaciones se llevó a cabo para determinar las relaciones entre los compuestos cuantificados y la actividad antioxidante mostrada por los extractos (Statgraphics-Plus versión 5.1, en las [publicaciones I-IV](#)).

La actividad antioxidante de los extractos y los compuestos cuantificados en ellos se intentaron relacionar con los diferentes métodos de deshidratación evaluados mediante análisis multivariante (Statgraphics-Plus versión 5.1, [publicación I](#)). También se correlacionó con análisis multivariante la actividad antimicrobiana de los extractos con el tipo de extracción y el material vegetal usado y la actividad antioxidante y la antimicrobiana con los compuestos bioactivos de los extractos [Statistix 9.0 (Analytical software, Tallahassee, EE.UU.), [artículo V](#)]. Posteriormente, mediante este tipo de análisis, se intentó establecer las posibles relaciones entre los compuestos identificados en los extractos de piel y de semilla y las variedades de mango evaluadas, el tipo de extracción y el material vegetal utilizado (SPSS Inc., [artículo VI](#)). Las técnicas multivariantes en cualquiera de los casos fueron el Análisis Cluster (*Cluster Analysis*, CA) y el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA) ([artículo V y VI](#)). En el CA se seleccionó la distancia Euclídea como medida de similitud y el método Ward como criterio de agrupación. Los resultados del CA se representaron en dendrogramas, en los que se tomó como punto de corte arbitrario un nivel de similitud < 50. Debido a que el CA sólo da información sobre la similitud de las distintas muestras y no es un análisis concluyente por sí sólo, se llevó a cabo el PCA; con ésta técnica se consigue representar mediante nuevos componentes la mayor parte de la variabilidad presentada por los datos. En todos los PCA llevados a cabo en los diferentes estudios, se seleccionaron dos Componentes Principales (*Principal Component*, PC) tomando como base de selección el criterio de Kaiser que consiste en conservar los PC cuyos valores propios son mayores que 1,0.

El diseño de experimentos seleccionado para el estudio de distintos factores (contenido de agua en la mezcla de disolventes, relación peso de material vegetal y volumen de disolvente, número de pasos del proceso de extracción, tiempo de extracción y pH del agua en el extractante) que afectan a la extracción de compuestos bioactivos a partir de los biorresiduos del mango ([publicaciones III y IV](#))

fue el Diseño Central Compuesto (*Central Composite Design*, CCD) “2⁵+star” centrado en las caras, con dos puntos centrales; este diseño permitió identificar la relación entre los cinco factores independientes citados y las variables dependientes o respuestas, así como para determinar las condiciones óptimas para el proceso de extracción (Statgraphics-Plus versión 5.1). A los factores de extracción se les dio tres niveles o valores diferentes (ver Resultados). Cada diseño consistió en 44 experimentos aleatorios (n = 132, porque cada experimento se realizó por triplicado), con 32 puntos factoriales, 2 puntos centrales y 10 puntos axiales. La actividad antioxidante y el contenido en compuestos bioactivos fueron seleccionados como las variables dependientes debido a su conocida dependencia del proceso de extracción. Los datos obtenidos del CCD fueron aproximados a una ecuación polinómica de segundo orden y se les realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para generar los coeficientes de interacción lineal, cuadrático y de regresión, con un nivel de confianza de $p < 0,005$. Los Factores de Contribución (FC) de cada factor en relación a la actividad antioxidante y contenido en compuestos fitoquímicos de los extractos se obtuvieron a partir del ANOVA y se calcularon a partir del porcentaje del efecto estandarizado del nivel de significación de cada interacción o factor principal respecto al total de efectos estandarizados para todas las interacciones y efectos principales. Se llevaron a cabo experimentos para determinar la fiabilidad del modelo usando combinaciones de variables a diferentes niveles (dentro del intervalo experimental).

Bibliografía

- AOAC International. (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. 15 ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, EE.UU., 1058-1059.
- Arnao, M.B., Cano, A. & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239-244.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Commission Internationale de L'Eclairage. (1986). *Colorimetry*. 2ª ed., Publication nº CIE 15.2, Central Bureau of the CIE, Viena, Austria.
- Cubas, C., Lobo, M.G. & González, M. (2008). Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology. *Journal Food Composition and Analysis*, 21, 125-133.
- FAO/IAEA. (2000). *Quantification of tannins in tree foliage*. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Viena, Austria, pp. 26.
- González, M. & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2, 1842-1866.
- González-Montelongo, R., Lobo, M.G. & González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119, 1030-1039.
- González-Paramás, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery by-products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 234-238.
- Hernández, Y., Lobo, M.G. & González, M. (2005). Aptitud al procesado mínimo de cuatro cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). En: *Avances de la Ciencia y*

- Tecnología de los Alimentos en los inicios del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Burgos, Burgos, España, 445-448.
- Lee, J., Durst, R.W., & Wrolstad, R.E (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of the AOAC International*, 88, 1269-1278.
- Llorach, R., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. & Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus L.*) by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Miller, H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 91.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). *Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts: approved standard*. 2^a ed., Documento M27-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, EE.UU.
- Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W. & Tan, C.P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120, 290-295.
- Torres, C.A., Fernández-Galván, D. & Galán-Saúco, V. (1997). *Guía descriptiva de cultivares de mango*. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación Gobierno de Canarias, Islas Canarias, España, pp. 44.
- van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H. & Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, 511-517.

Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

1. Estabilización del material vegetal

Los biorresiduos frescos tienen un alto contenido en agua, lo que favorece el crecimiento de microorganismos en ellos así como el que tengan lugar reacciones químicas y enzimáticas en los compuestos bioactivos presentes en los mismos; esto hace que se pierdan los compuestos fitoquímicos contenidos en estos biorresiduos y que por lo tanto se reduzca la capacidad antioxidante asociada a los mismos. Por todo ello, es necesaria la estabilización del material vegetal antes de que tenga lugar la extracción. En los procesos de estabilización, el tiempo, la temperatura y el sistema de deshidratación empleado son los factores que más influyen en la calidad final de los materiales vegetales a estabilizar.

En la primera publicación presentada en la presente Tesis Doctoral se estudió el efecto de tres sistemas de deshidratación (liofilización y secado en estufa a 70 °C con aire estático o con aire forzado) sobre el contenido de polifenoles y clorofilas así como sobre la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de la piel y la semilla de mango.

La pérdida de agua de la semilla durante la deshidratación fue similar en todos los tratamientos evaluados (Tabla 1). Sin embargo, en piel, hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos de secado, mostrando la piel secada en estufa a 70 °C una pérdida de agua ligeramente superior a la piel liofilizada (Tabla 1).

En lo que se refiere a los cambios en el color de los biorresiduos sometidos a tratamientos de deshidratación, los cuales se han relacionado con la modificación en el contenido en compuestos bioactivos coloreados (compuestos fenólicos y antocianos) presentes en los mismos, se observó que tanto la piel como la semilla de mango deshidratadas mostraron variaciones en el color con respecto al material sin deshidratar. La piel liofilizada fue la que presentó la mayor luminosidad mientras que el valor más bajo de cromaticidad lo mostró la piel secada en estufa con aire forzado. En cambio, la piel sin deshidratar se caracterizó por tener el matiz (ángulo hue) más elevado. En el caso de la semilla, la semilla liofilizada presentó la mayor

luminosidad y matiz, y sin embargo, la semilla secada en estufa y la no deshidratada presentaron los valores más altos de cromaticidad (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del método de deshidratación empleado en la estabilización de la piel y semilla de mango sobre la pérdida de agua y el color

Tratamientos deshidratación	Pérdida de agua (%)	L*	h°	C*
Piel				
Sin deshidratar (control)	-	50 ± 1 ^d	86 ± 2 ^a	26 ± 2 ^a
Liofilizada	71 ± 2 ^b	64 ± 1 ^a	77 ± 1 ^c	24 ± 1 ^b
Estufa aire estático 70 °C	74 ± 2 ^a	53 ± 1 ^b	75 ± 2 ^d	24 ± 2 ^{ab}
Estufa aire forzado 70 °C	72 ± 5 ^a	52 ± 1 ^c	79 ± 1 ^b	19 ± 1 ^c
Semilla				
Sin deshidratar (control)	-	65 ± 1 ^d	89 ± 1 ^b	19 ± 1 ^a
Liofilizada	51 ± 6 ^a	76 ± 1 ^a	91 ± 1 ^a	14 ± 1 ^d
Estufa aire estático 70 °C	47 ± 1 ^a	72 ± 1 ^b	87 ± 1 ^c	18 ± 1 ^b
Estufa aire forzado 70 °C	54 ± 4 ^a	69 ± 1 ^c	84 ± 1 ^d	16 ± 1 ^c

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p ≤ 0,050) entre los tratamientos de deshidratación. L*, luminosidad; h°, ángulo hue; C*, cromaticidad

Los tratamientos de deshidratación favorecieron la capacidad de extracción compuestos bioactivos. Así, la estabilización de la piel y la semilla del mango por deshidratación mejoró el rendimiento de la extracción y el contenido en compuestos bioactivos respecto del control (material vegetal sin deshidratar) entre 1,5-4,0 veces (Tabla 2), independientemente del método de deshidratación empleado (liofilización, secado en estufa a 70 °C con aire estático o con aire forzado). En lo que se refiere al contenido en compuestos bioactivos, responsables de la actividad antioxidante, tanto la piel como la semilla de mango presentaron cantidades importantes de compuestos fenólicos (Tabla 2); sin embargo, los antocianos y las clorofilas sólo se detectaron en piel. En el caso de la semilla liofilizada, el contenido en compuestos fenólicos fue mayor (1,2-2,0 veces) que el del material sometido a los otros tratamientos (Tabla 2).

Debido al bajo contenido detectado en antocianos y clorofilas, en los trabajos posteriores no se evaluó el contenido de estos compuestos.

Tabla 2. Rendimiento de la extracción y contenido en fenoles totales y antocianos de la piel y la semilla de mango sometidas a tres sistemas de deshidratación diferentes

Tratamientos deshidratación	Rendimiento (g/100 g DW)	Fenoles Totales (g/100 g DW)	Antocianos (mg/100 g DW)
Piel; etanol:agua (50:50, v:v)			
Sin deshidratar (control)	5,9 ± 1,4 ^{c/A}	7,7 ± 0,5 ^{a/B}	1,5 ± 0,2 ^{b/A}
Liofilizada	24 ± 1 ^{a/A}	9,2 ± 0,5 ^{a/A}	2,6 ± 0,4 ^{a/A}
Estufa aire estático 70 °C	20 ± 1 ^{b/A}	8,5 ± 0,7 ^{a/A}	1,5 ± 0,1 ^{b/A}
Estufa aire forzado 70 °C	20 ± 1 ^{b/A}	7,9 ± 0,5 ^{a/A}	2,2 ± 0,4 ^{a/A}
Piel; etanol			
Sin deshidratar (control)	6,0 ± 0,3 ^{c/A}	13 ± 1 ^{a/A}	1,9 ± 0,3 ^{b/A}
Liofilizada	16 ± 1 ^{a/B}	9,8 ± 0,3 ^{b/A}	3,3 ± 0,1 ^{a/A}
Estufa aire estático 70 °C	14 ± 1 ^{b/B}	4,6 ± 0,2 ^{c/B}	1,6 ± 0,2 ^{b/A}
Estufa aire forzado 70 °C	14 ± 1 ^{b/B}	4,6 ± 0,3 ^{c/B}	2,0 ± 0,2 ^{b/A}
Semilla; acetona:agua (50:50, v:v)			
Sin deshidratar (control)	4,0 ± 0,4 ^d	3,8 ± 0,1 ^c	-
Liofilizada	12 ± 1 ^a	7,4 ± 0,4 ^a	-
Estufa aire estático 70 °C	7,7 ± 0,4 ^b	6,0 ± 0,5 ^b	-
Estufa aire forzado 70 °C	5,3 ± 0,6 ^c	3,5 ± 0,3 ^c	-

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p ≤ 0,050) entre los tratamientos de deshidratación (a-d) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-B)

Con respecto a la actividad antioxidante, la capacidad de los extractos de piel obtenidos con etanol:agua (50:50, v:v) para inhibir la peroxidación lipídica (ensayo de las sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, TBARS y ensayo del blanqueamiento del β-caroteno) (Figura 1) y para atrapar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) (Tabla 3) no se vieron afectadas por los tratamientos de deshidratación cuando se compararon con la piel sin deshidratar (control). Sin embargo, los extractos obtenidos a partir de la piel liofilizada y secada en estufa con aire estático mostraron mayor capacidad de atrapamiento del radical 2,2-azino-bis-ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}) (entre 1,5 veces superior) que la piel no deshidratada (Tabla 3).

Cuando la extracción se llevó a cabo con etanol, la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (Figura 1) y para atrapar radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}) de la piel deshidratada (liofilizada y secada en estufa) se vieron disminuidas con respecto

al control. En ambos casos, el tratamiento que más negativamente afectó a la capacidad antioxidante fue el secado en estufa (Tabla 3).

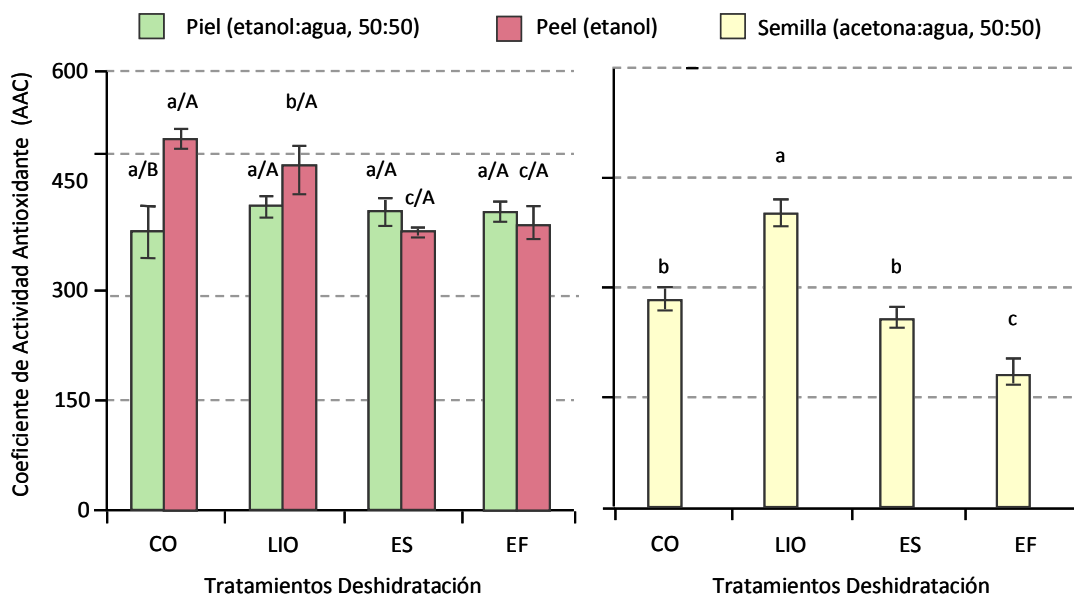


Figura 1. Efecto del sistema de deshidratación en la capacidad de la piel y la semilla de mango para inhibir la peroxidación lipídica medida usando el ensayo del blanqueamiento del β -caroteno. La piel y la semilla se deshidrataron mediante liofilización (LIO), secados en estufa a 70 °C con aire estático (ES) y con aire forzado (EF). El material no deshidratado (CO) fue usado como control. Cada proceso de deshidratación se realizó por triplicado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,050$) entre los tratamientos de deshidratación (a-d) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-B), respectivamente.

La capacidad de atrapar radicales libres (Tabla 3) y de prevenir la formación de TBARS (porcentaje de inhibición, $IP 41 \pm 3$) de los extractos obtenidos a partir de piel deshidratada, con etanol:agua (50:50, v:v), fue mejor que la capacidad de los extractos obtenidos con etanol (Tabla 3 y $IP 28 \pm 2$).

La liofilización mejoró la capacidad de la semilla de mango de prevenir el blanqueamiento del β -caroteno (Figura 1) y de atrapar radicales libres ($DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$) (Tabla 3) al compararlo con el material sin deshidratar. Así, la actividad antioxidante de la semilla liofilizada fue entre 1,5-2,5 veces superior a la de la semilla sin deshidratar o secada en estufa con aire estático y entre 2,0-4,5 veces superior a la de la semilla secada en estufa con aire forzado. Sin embargo, se observó que el secado en estufa con aire forzado disminuía la actividad antioxidante

de la semilla respecto del control (Tabla 3). Sólo los extractos obtenidos a partir de semilla liofilizada presentaron capacidad para prevenir la formación de TBARS.

Tabla 3. Efecto del sistema de deshidratación en la capacidad de la piel y la semilla de mango de atrapar radicales libres

Tratamientos deshidratación	DPPH* (g TE*/100 g DW)	ABTS*+ (g TE*/100 g DW)
Piel; etanol:agua (50:50, v:v)		
Sin deshidratar (control)	56 ± 9 ^{a/A}	25 ± 3 ^{b/A}
Liofilizada	48 ± 1 ^{a/A}	37 ± 4 ^{a/A}
Estufa aire estático 70 °C	44 ± 3 ^{a/A}	39 ± 2 ^{a/A}
Estufa aire forzado 70 °C	49 ± 4 ^{a/A}	34 ± 2 ^{a/A}
Piel; etanol		
Sin deshidratar (control)	33 ± 3 ^{a/B}	27 ± 2 ^{a/A}
Liofilizada	22 ± 1 ^{b/B}	22 ± 1 ^{b/B}
Estufa aire estático 70 °C	12 ± 1 ^{c/B}	11 ± 1 ^{c/B}
Estufa aire forzado 70 °C	11 ± 1 ^{c/B}	12 ± 1 ^{c/B}
Semilla; acetona:agua (50:50, v:v)		
Sin deshidratar (control)	18 ± 1 ^b	14 ± 1 ^b
Liofilizada	34 ± 2 ^a	32 ± 2 ^a
Estufa aire estático 70 °C	14 ± 1 ^c	14 ± 1 ^b
Estufa aire forzado 70 °C	7,8 ± 0,9 ^d	8,6 ± 1,1 ^c

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p ≤ 0,050) entre los tratamientos de deshidratación (a-d) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-B)

*TE, trolox acid equivalent antioxidant activity, actividad antioxidante equivalente al trolox

Las diferencias encontradas en el rendimiento de extracción de la piel deshidratada respecto de la no deshidratada (Tabla 2) no se correlacionan con los cambios que tienen lugar en la actividad antioxidante, por lo que se pueden estar co-extrayendo compuestos sin actividad antioxidante. Los estudios realizados por Larrauri et al. (1996, 1997) asocian a la fibra como el posible compuesto que se co-extrae y que además es responsable de la actividad antioxidante de las pieles de los biorresiduos estudiados. Recientemente, se ha demostrado la presencia de fenoles asociados a la fibra de mango de las variedades “Raspuri” y “Badami” (Ajila & Prasada-Rao, 2013); entre dichos fenoles se identificaron el ácido gálico, ácido

protocateico, ácido siríngico, kaempferol, quercetina, ácido ferúlico y rutina. En la semilla deshidratada, en cambio, los incrementos observados en el rendimiento sí se correlacionan con un aumento de la actividad antioxidante de estos extractos.

La disminución en el contenido en compuestos fenólicos en los extractos etanólicos obtenidos a partir de la piel secada en estufa se correlacionan con la actividad antioxidante de dichos extractos, lo que es indicativo de que la disminución en la actividad antioxidante puede deberse a una degradación de los compuestos fenólicos a altas temperaturas debido a descomposición térmica, química o enzimática de estos compuestos (Nicoli et al., 1999). También puede ocurrir que a altas temperaturas los compuestos bioactivos reaccionen con otros componentes del material vegetal de tal manera que se impida su extracción. En el caso del secado en estufa con aire forzado, los compuestos fitoquímicos pueden además oxidarse debido a la acción del oxígeno circundante. Larrauri et al. (1997) no encontraron diferencias significativas en cuanto a la actividad antioxidante entre la piel de uva liofilizada y la secada en estufa con aire forzado a 60 °C; sin embargo, cuando se incrementó la temperatura a 100 ó 140 °C se observó una importante disminución en la capacidad antioxidante entre el 28 y el 50%, respectivamente. Además se observó, una disminución en el contenido en fenoles al aumentar la temperatura. Este comportamiento fue acompañado con una pérdida de luminosidad y de matiz de las muestras cuando éstas se comparaban con la piel de uva liofilizada.

Los estudios de Wojdylo et al. (2009) revelaron que, en general, el contenido en antocianos y fenoles, así como la capacidad para atrapar radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}) fue mayor en las fresas liofilizadas que en las secadas con convección de aire (70 °C) o al vacío (50 °C). Sin embargo, en la piel de manzana (Wolfe & Liu, 2003) se demostró que el contenido en fenoles y flavonoides de las pieles liofilizadas y secadas al aire (0,4-0,5 g equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g, respectivamente) fue similar al de la piel sin deshidratar (0,3 g equivalentes de catequina (CE)/100 g, respectivamente).

El contenido en fenoles totales de la semilla de mango liofilizada y la capacidad antioxidante fueron mayores que los de la semilla sin deshidratar (Tabla

2, Figura 1, Tabla 3). En numerosos estudios se demuestra que los procesos de estabilización mediante deshidratación, además de favorecer la conservación, mejoran la actividad antioxidante de los extractos y, en algunos casos, el contenido en compuestos bioactivos. Wojdylo et al. (2009) demostraron que el contenido en compuestos bioactivos aumentaba en las fresas liofilizadas respecto a las fresas sin deshidratar. Lo mismo se observó en hojas de morera (*Morus alba* L.) (Katsube et al., 2009) y piel de manzana (Wolfe & Liu, 2003) liofilizadas para las cuales el contenido en compuestos fenólicos y antocianos, respectivamente, fue muy superior al contenido en el material sin deshidratar. Esto puede ser explicado debido a que un alto porcentaje de los compuestos fenólicos se encuentran unidos a estructuras celulares y los sistemas de deshidratación permiten la liberación de esos compuestos desde la matriz vegetal, haciéndolos más fácilmente extraíbles. Otra posible explicación es que los polifenoles, en un estado intermedio de oxidación exhiben una eficiencia mayor para atrapar los radicales libres que los no oxidados, aunque también se ha descrito una pérdida posterior de las propiedades antioxidantes para las etapas de oxidación enzimática avanzadas (Nicoli et al., 1999).

Con el objeto de comprobar si las variables de calidad analizadas (contenido en compuestos bioactivos y actividad antioxidante) describen cómo los tratamientos de deshidratación evaluados afectan a la calidad de la piel y la semilla de mango, se analizaron los datos mediante análisis multivariante. El Análisis Clúster (*Cluster Analysis*, CA) señaló la existencia de tres grupos o clústeres formados por i) la piel de mango extraída con etanol:agua (50:50, v:v), sin deshidratar y sometida a todos los tratamientos de deshidratación, y la semilla liofilizada, ii) la piel, sin deshidratar y deshidratada, extraída con etanol, y iii) la semilla sin deshidratar y la secada en estufa a 70 °C. Debido a que el CA sólo aporta información acerca de las similitudes entre las diferentes muestras, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (*Principal Component Analysis*, PCA) ya que esta técnica permite estudiar toda la variabilidad existente en los datos. Dos Componentes Principales (*Principal Components*, PC) explican el 85% de la variabilidad total que presentan las muestras deshidratadas. En la Figura 2 (a) se

muestran las cargas factoriales resultado de la selección de los dos componentes principales. El componente principal 1 (PC1), que explica el porcentaje de varianza más alto (58%), está relacionado principalmente con la actividad antioxidante, los antocianos y los compuestos fenólicos. El segundo componente principal (PC2) (que explica el 27% de la varianza) está relacionado con las clorofilas totales y el contenido en clorofila *a* (ambos con una correlación positiva).

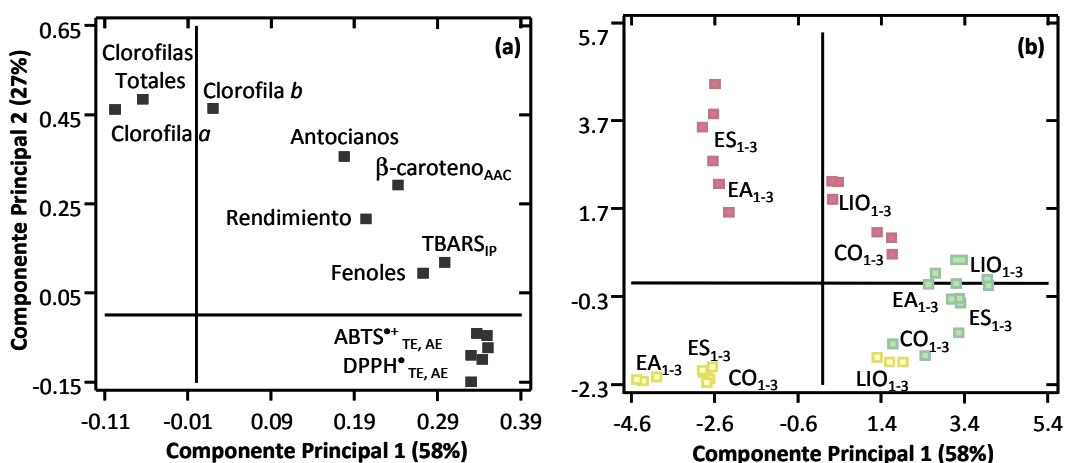


Figura 2. Grafico de distribución de las muestras de piel y semilla de mango (a) y de las cargas factoriales de las variables (b) en el plano formado por los dos primeros componentes principales. En rojo se representan los extractos obtenidos con etanol; en verde los obtenidos con etanol:agua y en amarillo los extractos de semilla obtenidos con acetona:agua.

La piel y la semilla se deshidrataron mediante liofilización (LIO), secado en estufa a 70 °C con aire estático (ES) y con aire forzado (EA). El material no deshidratado (CO) fue usado como control. La actividad antioxidante fue expresada como: AAC, coeficiente de actividad antioxidante; IP, porcentaje de inhibición; AA, porcentaje de atrapamiento (%); TE o AE, capacidad antioxidante equivalente al trolox o al ácido ascórbico (g/100 g MS). Se realizaron tres réplicas independientes de cada tratamiento, los subíndices indican el número de la muestra.

En la [Figura 2 \(b\)](#) se puede ver cómo las muestras son agrupadas de acuerdo a su calidad en tres grupos distintos: i) la piel de mango extraída con etanol:agua (50:50, v:v) y la semilla liofilizada, ii) la piel extraída con etanol, y iii) la semilla sin deshidratar y la secada en estufa. En consecuencia, se confirma que la piel de mango extraída con etanol:agua (50:50, v:v) y la semilla de mango liofilizada son los materiales vegetales con mayor actividad antioxidante (especialmente capacidad para atrapar radicales libres) y con mayor contenido en compuestos fenólicos. Por lo tanto, se puede concluir que la calidad de los extractos obtenidos, en términos de

actividad antioxidante, está en gran parte relacionado con el contenido en polifenoles del biorresiduo de mango.

Finalmente, la liofilización se consideró como el sistema de deshidratación más conveniente para estabilizar la piel y la semilla de mango sin que este procedimiento de deshidratación produzca una disminución en la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de estos materiales vegetales.

2. Elección del disolvente y temperatura de extracción

Una vez optimizadas las condiciones en las que se debe estabilizar el material vegetal de partida se evaluó el disolvente y la temperatura de extracción más adecuados para la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante a partir de la piel y la semilla de mango ([publicación II](#)). A continuación se expondrán los resultados obtenidos para ambos materiales.

Cuando la extracción se llevó a cabo a 25 °C, los extractos de piel obtenidos con etanol:agua (50:50, v:v), acetona y acetona:agua (50:50, v:v) fueron los más efectivos en cuanto a la prevención del blanqueamiento del β -caroteno (entre 1,2–1,8 veces superior al resto de disolventes evaluados) ([Tabla 4](#)). Se observó que la capacidad para prevenir el blanqueamiento del β -caroteno, de todos los extractos de piel de mango, mejoraba al incrementar la temperatura de extracción ([Tabla 4](#)); el aumento de temperatura afectó de forma más acusada a la extracción con metanol y etanol, presentando estos extractos una capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica hasta 4 veces superior a los extractos obtenidos a 25 °C con estos disolventes.

Los extractos obtenidos a 75 °C presentaron un incremento de la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica entre el 66% (etanol:agua 50:50, v:v) y el 80–87% (metanol:agua 50:50, v:v; metanol y acetona:agua 50:50, v:v) respecto del control sin antioxidantes ([Tabla 4](#)), cuando dicha actividad fue evaluada mediante el método TBARS. En cambio, en el caso de los extractos acuosos, la actividad antioxidante fue entre un 68% y un 79% inferior a la de los extractos obtenidos con otros disolventes.

Tabla 4. Efecto del disolvente y de la temperatura de extracción en la capacidad de los extractos de piel de mango de inhibir la peroxidación lipídica

Temperatura de extracción	Disolventes de extracción	Blanqueamiento β -caroteno (AAC*)	TBARS (IP%*)
25 °C	Metanol	201 ± 28 ^{c/B}	47 ± 1 ^{c/B}
	Etanol	155 ± 3 ^{d/C}	83 ± 5 ^{a/A}
	Acetona	265 ± 22 ^{ab/B}	61 ± 1 ^{b/B}
	Agua	219 ± 9 ^{c/B}	27 ± 5 ^{d/A}
	Metanol:agua (50:50, v:v)	209 ± 8 ^{c/B}	24 ± 2 ^{d/B}
	Etanol:agua (50:50, v:v)	286 ± 14 ^{a/A}	61 ± 7 ^{b/A}
	Acetona:agua (50:50, v:v)	256 ± 6 ^{b/B}	50 ± 1 ^{c/C}
50 °C	Metanol	822 ± 104 ^{a/A}	85 ± 1 ^{a/A}
	Etanol	548 ± 13 ^{b/B}	66 ± 3 ^{b/B}
	Acetona	433 ± 20 ^{c/A}	86 ± 3 ^{a/A}
	Agua	396 ± 16 ^{c/A}	18 ± 1 ^{d/B}
	Metanol:agua (50:50, v:v)	372 ± 18 ^{c/A}	84 ± 2 ^{a/A}
	Etanol:agua (50:50, v:v)	361 ± 32 ^{c/A}	63 ± 1 ^{c/A}
	Acetona:agua (50:50, v:v)	397 ± 20 ^{c/A}	68 ± 10 ^{b/B}
75 °C	Metanol	791 ± 26 ^{a/A}	86 ± 2 ^{a/A}
	Etanol	670 ± 88 ^{b/A}	75 ± 9 ^{bc/AB}
	Acetona	495 ± 25 ^{c/A}	69 ± 7 ^{c/B}
	Agua	440 ± 90 ^{cd/A}	28 ± 4 ^{e/A}
	Metanol:agua (50:50, v:v)	375 ± 18 ^{d/A}	80 ± 2 ^{ab/A}
	Etanol:agua (50:50, v:v)	355 ± 9 ^{d/A}	66 ± 6 ^{d/A}
	Acetona:agua (50:50, v:v)	393 ± 14 ^{d/A}	87 ± 2 ^{a/A}

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,050$) entre los tratamientos de deshidratación (a-e) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-C), respectivamente. * AAC, coeficiente de actividad antioxidante; IP, porcentaje de inhibición

Los extractos de piel obtenidos con metanol:agua (50:50, v:v), etanol agua (50:50, v:v), acetona:agua (50:50, v:v) y metanol presentaron la mayor capacidad para atrapar los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. Se observó que la capacidad de atrapamiento de los extractos de piel aumentaba (aproximadamente 1,5 veces) a temperaturas superiores a 25 °C, especialmente en las extracciones con etanol:agua

(50:50, v:v) y etanol (Figura 3). La menor capacidad de atrapamiento de radicales libres la presentaron los extractos acuosos.

En cuanto al contenido en compuestos bioactivos, los extractos de piel de mango presentaron cantidades considerables de flavonoides (0,17-0,70 g CEs/100 g MS), taninos (1,1-11 g equivalentes de ácido tánico (TAEs)/100 g MS), y proantocianidinas (0,12- 0,58 g equivalentes de leucoantocianidina (LEs/100 g MS). Los taninos representaron entre el 88% y el 94% del total de compuestos fitoquímicos encontrados en los extractos de piel, excepto en los extractos obtenidos con acetona, en los que el contenido en taninos fue entre el 59-81% del total de compuestos evaluados. Los extractos obtenidos con metanol, etanol:agua (50:50, v:v), y acetona:agua (50:50, v:v) tenían el mayor contenido en compuestos fenólicos (suma de flavonoides, taninos, y proantocianidinas): 8,1-12 g/100 g MS. Por otra parte, para los extractos acuosos el contenido en compuestos fitoquímicos fue entre un 20-79% más bajo que en el resto de extractos obtenidos con otros disolventes. El impacto de la temperatura de extracción en el contenido en compuestos bioactivos de los extractos de piel fue bajo en comparación con el impacto del disolvente de extracción; sin embargo, se observó que al incrementar la temperatura, de 25 a 75 °C, se favorecía la extracción de flavonoides con acetona:agua (50:50, v:v) (de 0,43 a 0,56 g CEs/100 g MS, respectivamente), de taninos con acetona (de 1,1 a 3,3 g TAEs/100 g MS, respectivamente) y acetona:agua (50:50, v:v) (de 7,1 a 11 g TAEs/100 g MS, respectivamente), y de proantocianidinas con etanol (de 0,32 a 0,43 g LEs/100 g MS, respectivamente), metanol:agua (50:50, v:v) (de 0,23 a 0,32 g LEs/100 g MS, respectivamente), o acetona:agua (50:50, v:v) (de 0,38 a 0,52 g LEs/100 g MS, respectivamente).

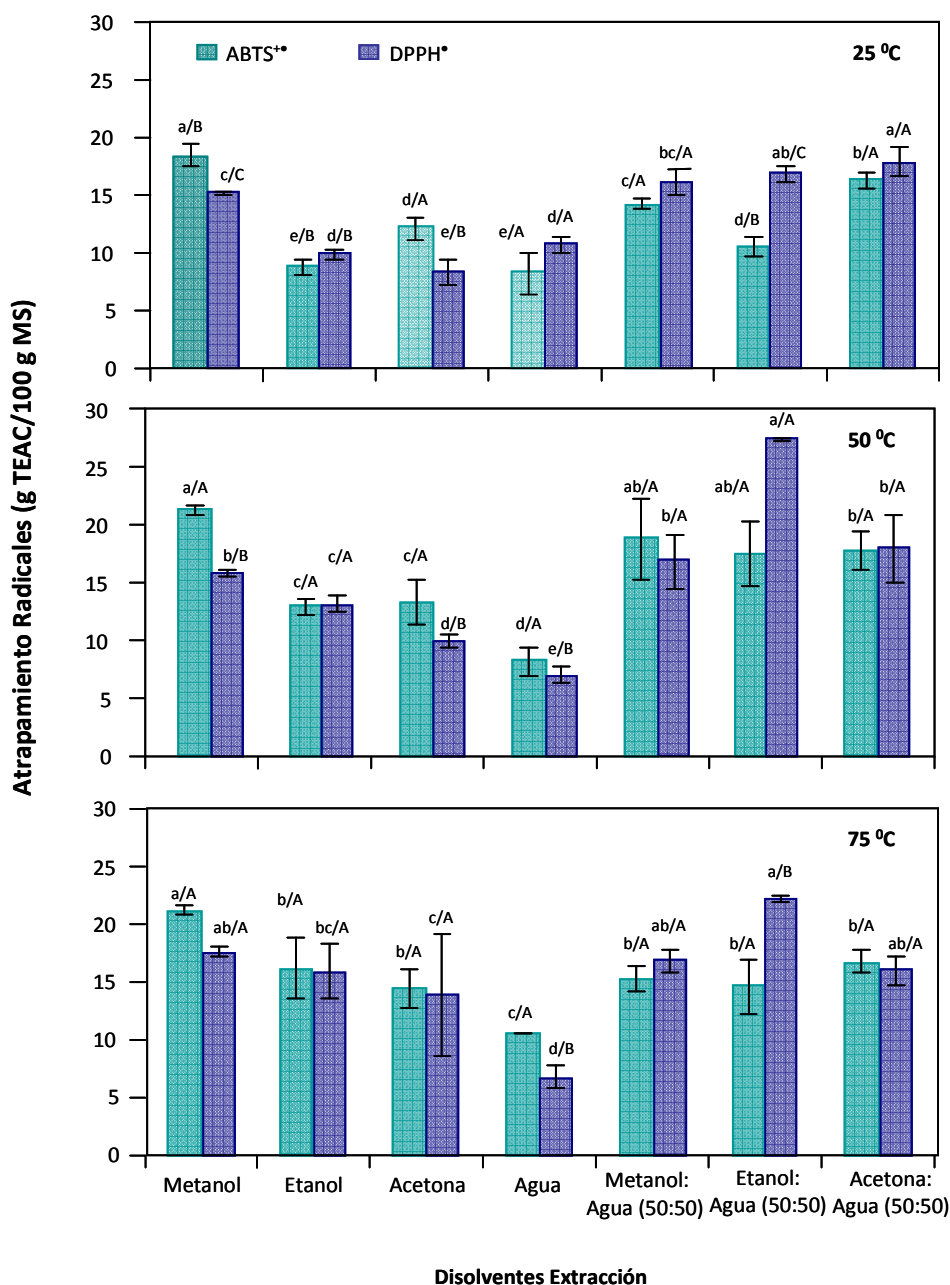


Figura 3. Efecto del disolvente y de la temperatura de extracción en la capacidad de los extractos de piel de mango de atrapar radicales libres TEAC, capacidad antioxidante equivalente al trolox; MS, datos expresados en materia seca. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,050$) entre los tratamientos de deshidratación (a-e) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-C), respectivamente

El estudio de correlaciones permitió establecer relaciones entre los compuestos bioactivos cuantificados y la capacidad antioxidante de los extractos de piel. En general, se observó que la correlación entre los compuestos bioactivos y la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica fue relativamente débil. Los coeficientes de correlación señalaron una relación moderadamente fuerte entre la

capacidad de atrapamiento de radicales y el contenido en proantocianidinas ($p = 0,000$; $R = 0,502$ para el radical DPPH $^{\bullet}$ y $R = 0,611$ para el radical ABTS $^{\bullet+}$). En el caso de la capacidad de los extractos de piel de atrapar el radical ABTS $^{\bullet+}$ se observó una correlación moderadamente fuerte con el contenido en taninos en los mismos ($p = 0,010$; $R = 0,472$).

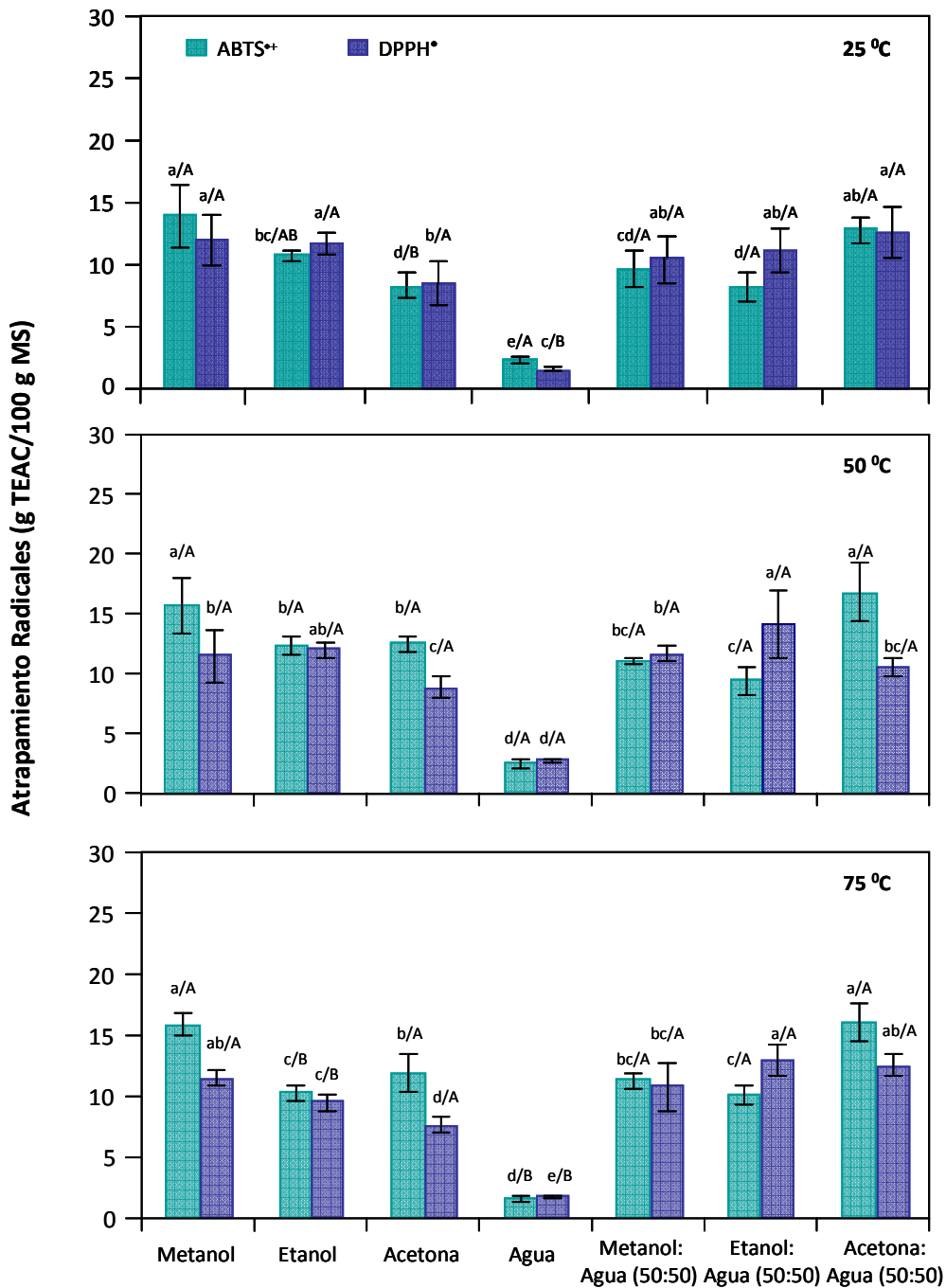
Todos los extractos de semilla de mango presentaron una alta capacidad para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno (Tabla 5), siendo los extractos obtenidos con metanol y mezclas con metanol, etanol, y acetona con agua (50:50, v:v) los más eficientes en inhibir la peroxidación lipídica. La capacidad antioxidante aumentó (1,6-2,4 veces) cuando se incrementó la temperatura de extracción. Cuando la extracción se llevó a cabo a 25 °C, los extractos obtenidos con etanol y acetona fueron los más efectivos cuando la inhibición de la peroxidación lipídica se determinó con el método TBARS (Tabla 5). El aumento de la temperatura de extracción mejoró la capacidad antioxidante de los extractos de semilla de mango obtenidos con metanol, etanol:agua (50:50, v:v) y acetona:agua (50:50, v:v) mientras que ésta disminuyó en los obtenidos con los disolventes etanol y acetona. Los extractos acuosos presentaron una capacidad para prevenir la formación de TBARS entre 1,5 y 4 veces inferior a la de los extractos obtenidos con los otros disolventes.

Los extractos de semilla de mango presentaron una fuerte capacidad de atrapamiento de los radicales DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{\bullet+}$ (Figura 4), siendo los extractos obtenidos con metanol y acetona:agua (50:50, v:v) los más efectivos en el atrapamiento de ambos radicales. El impacto de la temperatura de extracción en la capacidad de atrapamiento de radicales libres de los extractos de semilla fue prácticamente despreciable en comparación con el efecto del disolvente. Los extractos acuosos fueron los que presentaron la actividad más baja para atrapar los radicales DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{\bullet+}$.

Tabla 5. Efecto del disolvente y de la temperatura de extracción en la capacidad de los extractos de semilla de mango de inhibir la peroxidación lipídica

Temperatura de extracción	Disolventes de extracción	Blanqueamiento β -caroteno (AAC*)	TBARS (IP%*)
25 °C	Metanol	218 ± 19 ^{a/B}	44 ± 10 ^{c/B}
	Etanol	192 ± 1 ^{b/C}	87 ± 1 ^{a/A}
	Acetona	133 ± 10 ^{d/C}	85 ± 4 ^{a/A}
	Agua	161 ± 19 ^{c/C}	27 ± 2 ^{d/A}
	Metanol:agua (50:50, v:v)	237 ± 3 ^{a/C}	18 ± 3 ^{d/C}
	Etanol:agua (50:50, v:v)	223 ± 18 ^{a/B}	48 ± 7 ^{c/B}
	Acetona:agua (50:50, v:v)	229 ± 9 ^{a/B}	73 ± 4 ^{b/B}
50 °C	Metanol	444 ± 50 ^{ab/A}	78 ± 9 ^{a/A}
	Etanol	293 ± 12 ^{c/B}	60 ± 3 ^{bc/B}
	Acetona	321 ± 32 ^{c/A}	67 ± 2 ^{b/B}
	Agua	472 ± 19 ^{a/A}	23 ± 4 ^{d/A}
	Metanol:agua (50:50, v:v)	457 ± 31 ^{a/A}	53 ± 3 ^{c/B}
	Etanol:agua (50:50, v:v)	459 ± 4 ^{a/A}	80 ± 4 ^{a/A}
	Acetona:agua (50:50, v:v)	394 ± 48 ^{b/A}	85 ± 1 ^{a/A}
75 °C	Metanol	523 ± 45 ^{a/A}	68 ± 3 ^{c/A}
	Etanol	361 ± 6 ^{c/A}	52 ± 1 ^{e/C}
	Acetona	265 ± 3 ^{d/B}	58 ± 1 ^{d/C}
	Agua	331 ± 46 ^{c/B}	20 ± 3 ^{f/A}
	Metanol:agua (50:50, v:v)	368 ± 4 ^{c/B}	66 ± 1 ^{c/A}
	Etanol:agua (50:50, v:v)	467 ± 6 ^{b/A}	82 ± 4 ^{a/A}
	Acetona:agua (50:50, v:v)	439 ± 14 ^{b/A}	72 ± 5 ^{b/B}

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,050$) entre los tratamientos de deshidratación (a-f) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-C), respectivamente. * AAC, coeficiente de actividad antioxidante; IP, porcentaje de inhibición



Disolventes Extracción

Figura 4. Efecto del disolvente y de la temperatura de extracción en la capacidad de los extractos de semilla de mango de atrapar radicales libres

TEAC, capacidad antioxidante equivalente al trolox; MS, datos expresados en materia seca. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,050$) entre los tratamientos de deshidratación (a-e) o entre los disolventes de extracción usados para obtener extractos a partir de piel de mango (A-C), respectivamente

La mayoría de los extractos de semilla de mango presentaron cantidades importantes de taninos y proantocianidinas, representando entre el 42-93 % y el 5-49%, respectivamente, del total de compuestos bioactivos determinados (flavonoides, taninos, y proantocianidinas). El mayor contenido en compuestos bioactivos se obtuvo para los extractos obtenidos con acetona:agua (50:50, v:v) (15-21 g/100 MS) y con metanol (12-17 g/100 g MS), mientras que los extractos acuosos (alrededor de 2,0 g/100 g MS) mostraron el contenido más bajo. Aunque el efecto de la temperatura fue poco importante comparado con el efecto del disolvente de extracción, sin embargo, la extracción de taninos aumentaba entre un 50% y un 70%, cuando la temperatura de extracción se incrementó desde 25 a 75 °C, en los extractos obtenidos con etanol (desde 3,5 a 9,6 g TAEs/100 g MS, respectivamente), acetona (desde 2,1 a 6,9 g TAEs/100 g MS, respectivamente), o etanol:agua (50:50, v:v) (desde 4,3 a 8,3 g TAEs/100 g MS, respectivamente).

En el caso de los extractos de semilla de mango, las correlaciones entre los compuestos bioactivos y la inhibición de la peroxidación lipídica fueron relativamente débiles; la inhibición del blanqueamiento del β -caroteno se correlacionó con los taninos ($p = 0,012$; $R = 0,314$) y la inhibición de la formación de TBARS con los flavonoides ($p = 0,005$; $R = 0,349$), taninos ($p = 0,005$; $R = 0,349$) y proantocianidinas ($p = 0,009$; $R = 0,325$). Por otra parte, los coeficientes de correlación indicaron una relación moderadamente fuerte ($p = 0,000$) entre los flavonoides ($R = 0,650$), taninos ($R = 0,624$), y proantocianidinas ($R = 0,539$) con la capacidad de los extractos de mango de atrapar el radical DPPH[•] y entre los taninos ($R = 0,568$) y el atrapamiento del radical ABTS^{•+}. Todas las correlaciones fueron positivas, por lo que a medida que aumenta el contenido en compuestos bioactivos se incrementa la actividad antioxidante de los extractos

Si se analizan los resultados expuestos, se puede concluir que la piel y la semilla de mango presentan cantidades considerables de compuestos fitoquímicos con una importante actividad antioxidante, siendo el disolvente y la temperatura de extracción dos factores que se deben tener en cuenta en la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante.

La polaridad del disolvente así como la diferente naturaleza de los compuestos fenólicos afectan a la eficiencia de la extracción y a la actividad de los extractos obtenidos (González & González, 2010; Azmir et al., 2013). Las formas agliconas altamente hidroxiladas de los polifenoles son solubles en alcoholes y sus mezclas con agua, en cambio, los compuestos menos polares y las formas altamente metoxiladas de los fenoles son solubles en disolventes menos polares como por ejemplo la acetona (Lafka et al., 2007). Además, hay que tener en cuenta que cuando el material vegetal está deshidratado, los disolventes de baja polaridad solamente producen la lixiviación de los polifenoles libres, mientras que los disolventes alcohólicos producen la ruptura de las membranas celulares permitiendo así la extracción de los materiales endocelulares (Robards, 2003)([ver Introducción sección 4.3.6; Figura 4](#)).

Como se ha descrito, los disolventes más adecuados para obtener extractos con alta actividad antioxidante, a partir de piel y semilla de mango, fueron el metanol, metanol:agua (50:50, v:v), etanol:agua (50:50, v:v) y acetona:agua (50:50, v:v). De igual manera, el contenido en compuestos fitoquímicos (flavonoides, taninos, y proantocianidinas) fue más alto en los extractos de piel obtenidos con metanol, etanol:agua (50:50, v:v) y acetona:agua (50:50, v:v) y en los extractos de semilla obtenidos con metanol o acetona:agua (50:50, v:v). Estos resultados coinciden con los descritos en la bibliografía para la obtención de compuestos antioxidantes a partir de biorresiduos de mango, ya que los disolventes de extracción más empleados han sido las mezclas metanol, etanol o acetona (entre 50-95 %) con agua (Kabuki et al., 2000; Soong & Barlow, 2004; Berardini et al., 2005; Abdalla et al., 2007; Ajila et al., 2007). Entre éstos, la mezcla acetona:agua (50:50, v:v) es uno de los disolventes más eficientes para la extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos (Shui & Leong, 2006; González-Montelongo et al., 2010a), y de forma más específica en la extracción de polifenoles a partir de matrices proteicas ya que en ellas parece que este disolvente produce la degradación de los complejos polifenol-proteína (Kallithraka et al., 1995). Esto podría explicar la eficiencia de este disolvente en la extracción de antioxidantes a

partir de semilla de mango, ya que se ha descrito que este material tiene un alto contenido en proteínas (6,7 g/100 g MS) (Abdalla et al., 2007).

La baja capacidad antioxidante y el bajo contenido en compuestos fitoquímicos observado en los extractos acuosos podría estar relacionado con el carácter no polar de las paredes celulares de la piel y de la semilla de mango; esta característica puede ser la causa de que los disolventes menos polares que el agua (metanol, etanol y acetona) extraigan compuestos antioxidantes de las células más fácilmente. Resultados similares se han descrito para subproductos de uva (Lapornik et al., 2005) y hojas de murtila (*Ugni molinae* Turcz) (Rubilar et al., 2006), materiales para los que el agua no fue un medio adecuado de extracción, mientras que las mezclas de agua con alcoholes fueron disolventes más eficientes. Otra posible explicación podría ser debido a la acción de degradación de la enzima polifenol-oxidasa sobre los polifenoles en extractos acuosos (lo que coincide con el matiz marrón observado en estos extractos), mientras que en otros disolventes la enzima permanece inactiva (González-Montelongo et al., 2010a).

Como se citó en la introducción ([ver sección 4.3.1](#)), el uso de disolventes orgánicos por la industria alimentaria en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes está estrictamente regulado (Directiva 88/344/CEE, Consejo de la Unión Europea; Directiva 92/115/CEE, Consejo de la Unión Europea, 1992; Directiva 94/52/CE, Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 1994; Directiva 97/60/CE, Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 1997). Por lo tanto, aunque los extractos de piel y semilla de mango obtenidos con metanol poseen alta capacidad antioxidante, el uso de este disolvente por parte de la industria alimentaria está restringido de tal manera que sólo debe existir un residuo máximo de 10 mg/kg de este disolvente en los productos alimenticios o en los ingredientes extraídos (RD 1101/2011, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España, 2011). Por lo que, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es preferible elegir para la extracción disolventes como el etanol, etanol:agua o acetona:agua, ya que los extractos obtenidos con ellos tienen una notable actividad antioxidante y contenido en compuestos fitoquímicos, además de ser disolventes considerados como respetuosos con el medioambiente y seguros

desde el punto de vista alimentario (RD 1101/2011, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España, 2011). En otros estudios, se ha tomado decisiones similares; por ejemplo, Lapornik et al. (2005) describieron que el metanol presentó mejores características para la extracción de polifenoles que el etanol a partir de subproductos de grosella roja (*Ribes rubrum* var. "Rondom"), grosella negra (*Ribes nigrum* var. "Rosenthal") y de uva (*Vitis vinifera* var. "Pinot Noire"); sin embargo, el etanol fue seleccionado como el mejor disolvente al tener en cuenta los aspectos relacionados a la seguridad alimentaria.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, en general, la temperatura favorece la capacidad de los extractos de piel y semilla de mango para inhibir la peroxidación lipídica; sin embargo, el efecto de este factor sobre el contenido en compuestos bioactivos y en la capacidad de atrapar radicales libres fue prácticamente despreciable en comparación con el efecto del disolvente. Las altas temperaturas han sido consideradas como favorecedoras de la eficiencia de la extracción, debido a que producen un aumento de la difusión y de la solubilidad de los compuestos en el disolvente. Sin embargo, también se ha descrito que a altas temperaturas se produce la degradación de los compuestos fitoquímicos (Yap et al., 2009), debido a pérdidas por volatilización o la reacción con otros componentes del material vegetal que impiden la extracción de los compuestos bioactivos (González & González, 2010).

En esta primera etapa de optimización, y en relación a la actividad antioxidante y al contenido en compuestos fenólicos de los extractos de piel y de semilla de mango obtenidos, se encontraron importantes similitudes y discrepancias respecto a otros estudios realizados a partir de estos biorresiduos. De forma similar, en piel de mango, Ajila et al. (2007) extrajeron con etanol:agua o acetona:agua (80:20, v:v), a temperatura ambiente, los valores en cuanto al contenido en fenoles oscilaron entre 5,5-11 g GAEs/100 g MS; en semilla de mango Maisuthisakul & Gordon (2009) (extracción con 95% etanol, reflujo durante 3h) o Soong & Barlow (2004, 2006) [extracción con etanol:agua (50:50, v:v) a 70 °C] cuantificaron en los extractos 6,8 g TAEs/100 g MS o 12 g GAEs/100 g MS, respectivamente. Sin embargo, el contenido en compuestos fitoquímicos para

extractos de piel de mango encontrados por Berardini et al. (2005) fueron mucho más bajos (0,020-0,50 g/100 g MS de flavonoles-*O*- glicósidos y xantonas- *C*- glicósidos) [extracción con acetona:agua (80:20, v:v) a temperatura ambiente durante 3h]. Lo mismo se observó en los trabajos de Abdalla et al. (2007) con extractos obtenidos a partir de semilla de mango [extracción con metanol:agua (19:1, v:v) a 4 °C durante 4min] donde se cuantificaron 0,11 g GAEs/100 g MS y 0,023 g TAEs/100 g MS. Estas diferencias encontradas están relacionadas principalmente con las condiciones y la técnica de extracción empleadas para la obtención de compuestos antioxidantes a partir de la piel y la semilla del mango.

Como consecuencia de los resultados de este estudio se consideraron los disolventes etanol:agua (50:50, v:v) y acetona:agua (50:50, v:v), como disolventes óptimos para obtener extractos con elevada actividad antioxidante a partir de la piel y la semilla de mango, respectivamente. En lo que a la temperatura óptima de extracción se refiere, se consideró realizar las extracciones a 50 °C para obtener extractos con alta capacidad antioxidante a partir de semilla de mango, mientras que a 75 °C si el material vegetal utilizado es la piel del mango.

3. Optimización de los factores que afectan a la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la semilla de mango

Como se mencionó en el apartado anterior, no sólo la temperatura y el disolvente afectan a los procesos de extracción. Otros factores como el contenido de agua y el pH de la misma en la mezcla extractante, la relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente empleado, el número de pasos del proceso de extracción, así como el tiempo son factores que influyen en la obtención eficiente de extractos con elevada capacidad antioxidante; es por ello que se estudió el efecto de todos estos factores en la obtención de extractos a partir de semilla de mango ([publicación III](#)). Las técnicas de extracción empleadas fueron la extracción tradicional (*Tradicional Extraction*, TE) y la extracción asistida por microondas (*Microwave Assisted Extraction*, MAE).

De acuerdo con la experiencia previa adquirida en la extracción de la semilla de mango por nuestro grupo de investigación y con la de otros autores (Kabuki et

al., 2000; Berardini et al., 2004; Soong & Barlow, 2004; Soong & Barlow, 2006; Abdalla et al., 2007; Engels et al., 2009; Engels et al., 2010; Maisuthisakul & Gordon, 2009) se estableció un diseño experimental CCD, en el que se fijaron valores mínimos y máximos para cada uno de los cinco factores que pueden afectar a la extracción de forma potencial: contenido de agua en el extractante, que se varió entre 5 y 95%; relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente empleado, que se varió entre 1:10 y 1:50 (p/v); número de pasos del proceso de extracción, que se varió entre 1 y 3; tiempo de extracción, que se varió entre 0 y 120 min y el pH del agua en el extractante, que se varió entre 3 y 8. Dicho diseño contaba con un total de 44 experimentos. Otros factores como el tipo de extractante (acetona:agua), la temperatura de extracción (50 °C), el volumen de extractante (20 ml) y el volumen final de la extracción (60 ml) se mantuvieron constantes, ya que son datos optimizados previamente ([publicación II](#)).

Los coeficientes de correlación (R^2) indicaron que el modelo (valores propuestos) explicó entre un 82-92% de la variabilidad observada en los valores de actividad antioxidante y contenido en proantocianidinas obtenidos (valores experimentales) y un 61% de la variabilidad observada para el contenido en taninos (valores experimentales). La desviación estándar de las estimaciones, medida como desviación estándar de los residuales, estuvo comprendida entre 0,11 g LEs/100 g MS (proantocianidinas) y 50 AAC (blanqueamiento del β -caroteno) y el test estadístico de Durbin-Watson indicó que, debido a que los valores de p obtenidos fueron superiores a 0,050 para todas las determinaciones, no existe sospecha de autocorrelación de los residuales basada en el orden en el que los residuales tienen lugar en el grupo de datos obtenidos.

3.1. Contenido de agua en la mezcla del disolvente de extracción

En la optimización del tipo de disolvente ([publicación II](#)) se determinó que el disolvente óptimo de extracción, de entre los evaluados, para los extractos de semilla de mango era la mezcla acetona:agua (50:50, v:v); sin embargo, en ese estudio sólo se evaluaron los disolventes puros (acetona y agua) y la mezcla anteriormente citada. Debido a que se comprobó la importante influencia del

disolvente sobre la extracción, se evaluó el efecto de la variación del contenido en agua en esta mezcla entre 5 y 95%.

En este estudio se confirmó que el contenido de agua en la mezcla extractante fue el factor que más influyó en la obtención de extractos a partir de semilla de mango con alto contenido en compuestos fenólicos [con un factor de contribución (FC) de aproximadamente un 36% respecto al total de la contribución de todos los factores] y con elevada capacidad de atrapamiento de radicales (FC 61-70%). Sin embargo, este factor tuvo menor influencia en la capacidad de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno (FC 18 %).

Se observó que la capacidad de los extractos para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno y atrapar radicales libres (Figura 5) así como su contenido en compuestos fenólicos (taninos y proantocianidinas) (Figura 6) aumentaba cuando el contenido de agua en la mezcla extractante disminuía, siendo los valores óptimos de entre 5-50%, independientemente de los valores para el resto de factores involucrados en la extracción.

Resultados similares los obtuvieron Yap et al. (2009) con biorresiduos de carambola, donde el contenido de agua en la mezcla de acetona:agua fue estadísticamente el factor más significativo ($p < 0,010$) en la extracción de compuestos fenólicos. Estos autores concluyeron que altas proporciones de agua o de acetona (100%) en la mezcla no se traducen en un aumento del contenido en compuestos fenólicos en los extractos.

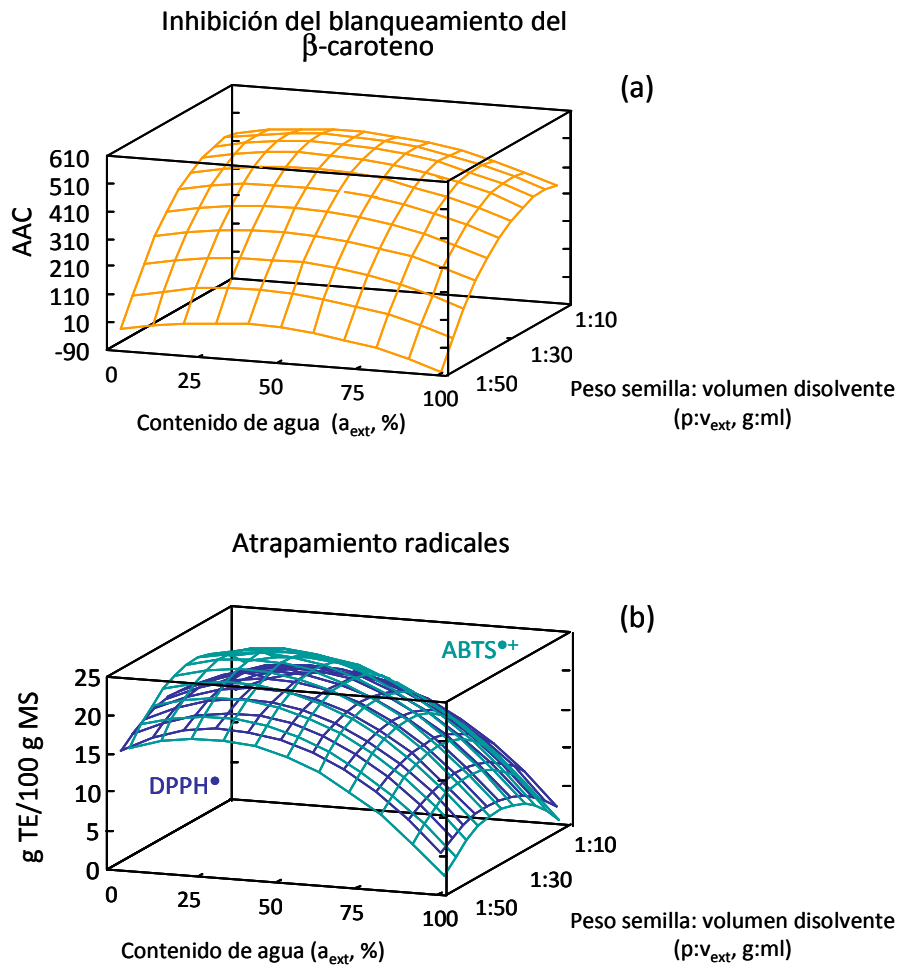


Figura 5. Gráficas Superficie Respuesta obtenidas representando los resultados para el contenido de agua en el extractante (a_{extr} , %) y la relación peso semilla:volumen de disolvente ($p:v_{\text{extr}}$, g/ml) para la inhibición del β -caroteno (a) y el atrapamiento de radicales libres (b) de los extractos, cuando se fija el tiempo de extracción en 0 min, el pH del agua en el extractante a 8,0 y el número de pasos de extracción a 3

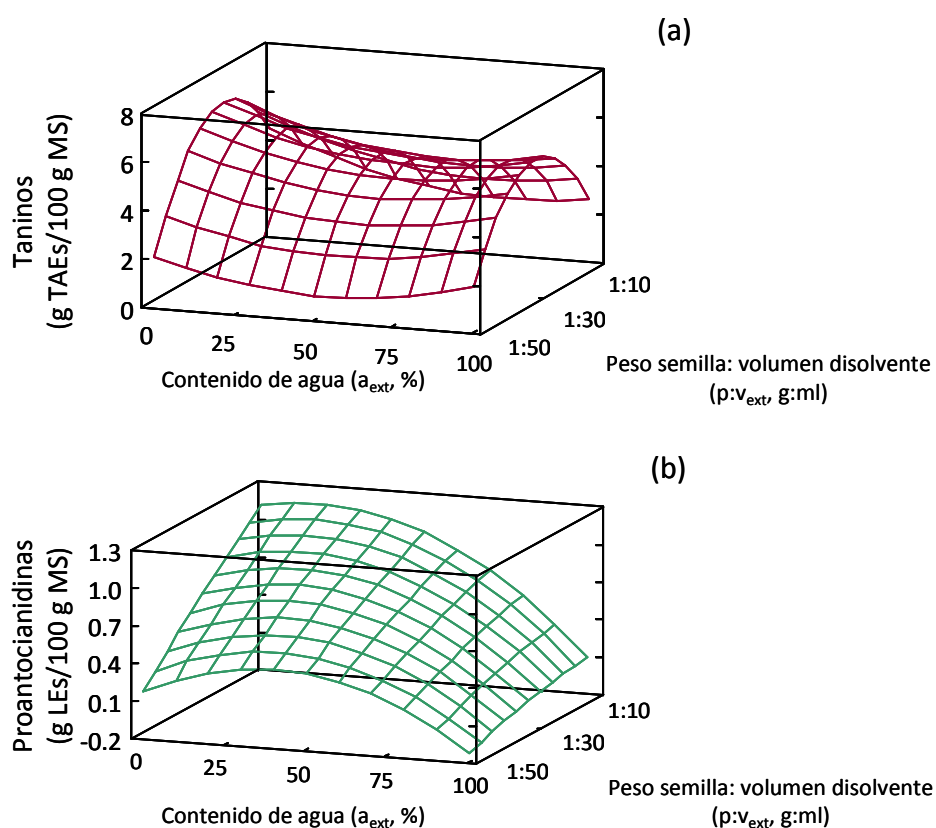


Figura 6. Gráficas Superficie Respuesta obtenidas representando los resultados para el contenido de agua en el extractante (a_{extr} %) y la relación peso semilla:volumen de disolvente ($p:v_{\text{extr}}$ g/ml) para el contenido en taninos (a) y proantocianidinas (b) de los extractos, cuando se fija el tiempo de extracción en 0 min, el pH del agua en el extractante a 8,0 y el número de pasos de extracción a 3

3.2. Relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente

La relación entre peso de material y el volumen de disolvente utilizado en la obtención de extractos a partir de semilla de mango fue el segundo factor con mayor impacto en la extracción eficiente de compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante de los mismos. Los valores de los FC de la relación peso de semilla:volumen de disolvente fueron del 52% en el caso de la capacidad de los extractos para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno, mientras que para la capacidad de atrapar radicales libres varió entre un 5,1-13%. En cuanto al contenido en compuestos fenólicos, la relación peso de semilla:volumen de disolvente fue especialmente importante en la extracción de taninos y proantocianidinas (FC 19 y 20%, respectivamente). La capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica

(Figura 5a), la extracción de taninos (Figura 6a) y proantocianidinas (Figura 6b) mejoró drásticamente (90%, 55% y 95%, respectivamente) cuando la relación peso-volumen de disolvente varió de 1:50 a 1:30 (p:v), siendo la relación 1:30 (p:v) la establecida como óptima. Es importante mencionar que la interacción entre el contenido de agua en la mezcla extractante y la relación peso de semilla de mango:volumen de disolvente influyó significativamente en la extracción de proantocianidinas (FC 12%), siendo la extracción óptima cuando el contenido de agua en la mezcla es bajo y la relación peso-volumen es de 1:30 (w:v) (Figura 6b). Pinelo et al. (2005) determinaron que la relación peso-volumen del disolvente jugaba un papel importante en la extracción de compuestos fenólicos y en la actividad antiradicalaria de extractos obtenidos a partir de orujo de uva, los resultados mostraron que las altas relaciones peso-volumen del disolvente fueron las óptimas (1:1, p:v) en vez de las bajas (1:5, p:v).

3.3. Número de pasos del proceso de extracción

El número de pasos del proceso de extracción influyó en el contenido de compuestos bioactivos y en la capacidad de los extractos de semilla para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno y atrapar radicales libres con un nivel de significación del 95%; sin embargo, el FC de este factor al proceso de extracción fue prácticamente despreciable (1,2–8,3%) (Figura 7) en comparación con el contenido de agua en el extractante y con la relación peso de semilla:volumen de disolvente. Sólo en el caso de la extracción de taninos, el FC fue mayor (13%) (Figura 8). En general, se puede concluir que la eficiencia de la extracción mejoró al aumentar el número de pasos de la extracción, siendo tres el número de pasos óptimos (Figura 7, 8).

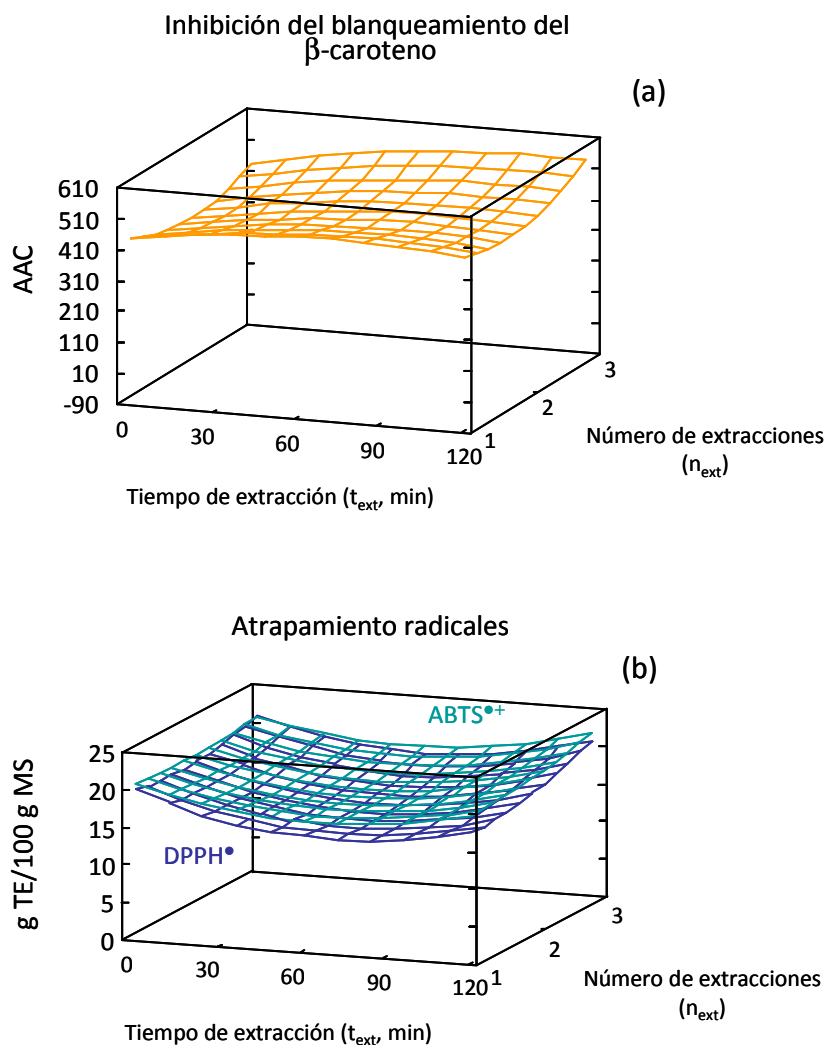


Figura 7. Gráficas Superficie Respuesta obtenidas trazando representando los resultados obtenidos teniendo en cuenta el tiempo de extracción (t_{extr} , min) y el número de procesos de extracción (n_{ext}) para la inhibición del β -caroteno (a) y el atrapamiento de radicales libres (b) de los extractos, cuando se fija el contenido de agua en el extractante en un 50%, el pH del agua a 8,0 y la relación peso de semilla de mango:volumen de extractante en 1:10 (v:w)

El número de pasos de extracción no es un factor que sea frecuentemente considerado en el estudio de las condiciones de obtención de extractos con actividad antioxidante y alto contenido en compuestos bioactivos; sin embargo, es considerado como un factor crucial en el proceso de extracción (González-Montelongo et al., 2010a). Los trabajos de González-Montelongo et al. (2010a) concluyeron que el número de pasos óptimos en la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante y un alto contenido en fenoles, a partir de la piel de plátano, era tres. Xu et al. (2008) describieron que una segunda extracción mejoraba

considerablemente la cantidad de compuestos fenólicos (con el consecuente incremento en la actividad antioxidante) obtenidos a partir de piel de cítricos. En la obtención de compuestos antioxidantes a partir de subproductos del mango (galotaninos, galatos, flavonoles, xantonas, antocianos o derivados de benzofenonas) normalmente se usan de dos a tres extracciones (Berardini et al., 2004; Soong & Barlow, 2004; Soong & Barlow, 2006; Barreto et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Engels et al., 2009; Engels et al., 2010).

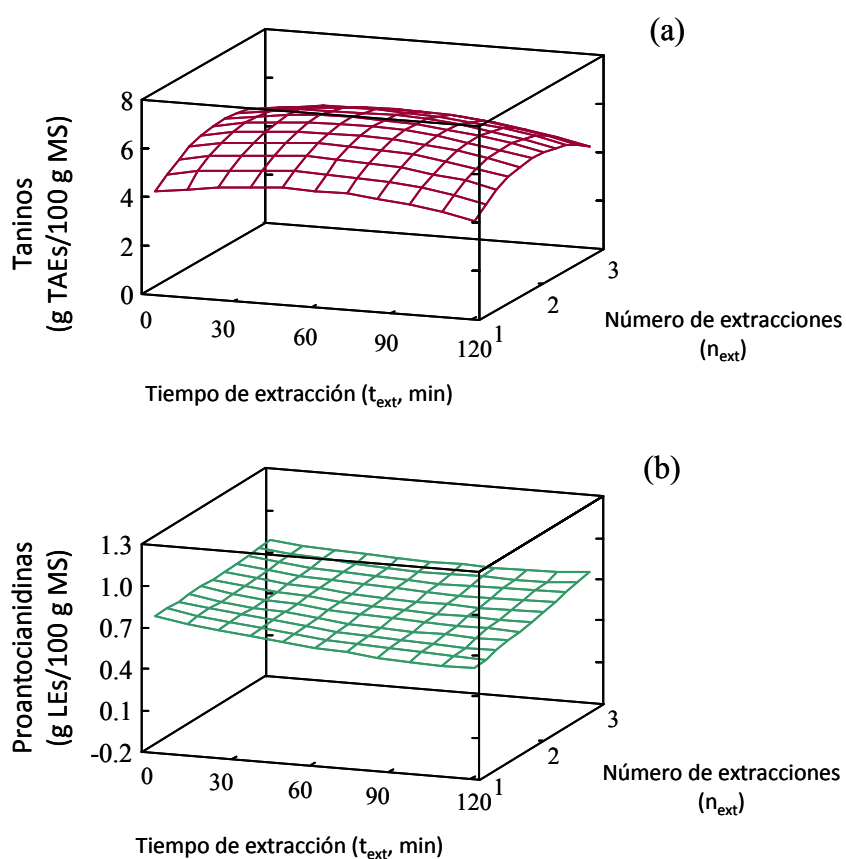


Figura 8. Gráficas Superficie Respuesta obtenidas representando los resultados para el tiempo de extracción (t_{extr} , min) y el número de procesos de extracción (n_{ext}) para el contenido en taninos (a) y proantocianidinas (b) en los extractos, cuando se fija el contenido de agua en el extractante en un 50%, el pH del agua a 8,0 y la relación peso de semilla de mango:volumen de extractante en 1:10 (v:w)

3.4. Tiempo de extracción

El tiempo de extracción afectó significativamente a la capacidad de atrapamiento de radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}) (Figura 7b) y al contenido en proantocianidinas (Figura 8b) de los extractos; sin embargo, el FC del tiempo de extracción fue muy bajo (4-7%) si se compara con el de otros factores como el contenido en agua del extractante y la relación peso de semilla:volumen de extractante. Además, el tiempo de extracción no tuvo efecto sobre el contenido en taninos (Figura 8a) y la capacidad de los extractos para prevenir el blanqueamiento del β -caroteno (Figura 7a). El tiempo óptimo de extracción, como tal, fue por lo tanto cero minutos; por lo que es suficiente con el tiempo de homogeneización (1min) y de centrifugación (20 min) para que se produzca la extracción de los compuestos fitoquímicos. Teniendo en cuenta este resultado, no es necesario el uso del microondas para hacer la extracción, lo que se traduce en una reducción de costos, rapidez y simplicidad del método de extracción a partir de semilla de mango.

La interacción del tiempo de extracción con la relación peso de semilla:volumen de disolvente fue la interacción de factores que influyó en mayor medida, en particular al contenido en taninos (FC 14%) y a la capacidad de los extractos de prevenir el blanqueamiento del β -caroteno (FC 10%). Los resultados obtenidos en este estudio (publicación III) demuestran que a largos tiempos de extracción (tanto en la TE como en la MAE) se puede producir la degradación de compuestos fitoquímicos. Tiempos cortos de extracción (0 min) fueron también propuestos por González-Montelongo et al. (2010a) en la extracción de antioxidantes a partir de piel de plátano. Pinelo et al. (2005) y Xu et al. (2008) señalaron que tiempos prolongados de extracción no mejoraban la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de orujo de uva y de piel de cítricos, respectivamente. Los resultados obtenidos por Yap et al. (2009) indicaron que un aumento del tiempo de extracción desde 1,5 a 4,5h reducía el contenido en compuestos fenólicos (66%) en extractos acetónicos procedentes de residuos de carambola. Spigno et al. (2007) concluyeron que la forma más eficiente de obtener extractos ricos en compuestos fenólicos y con alta actividad antioxidante, a partir de subproductos del orujo de uva, era usando altas temperaturas (60 °C) en cortos

periodos de tiempo (5h), en lugar de temperaturas más bajas (45 °C) durante largos periodos de tiempo (15h).

3.5. pH del agua en el extractante

El pH del agua fue el factor que menos efecto tuvo en la actividad antioxidante y en el contenido en compuestos bioactivos de los extractos obtenidos a partir de la semilla de mango, presentando un FC prácticamente despreciable del 1,0% y del 2,2% para la capacidad de los extractos de prevenir la peroxidación lipídica y para atrapar el radical DPPH[•], respectivamente. Se obtuvo un ligero incremento en la capacidad de los extractos para atrapar el radical DPPH[•] cuando el pH aumentaba desde 3,0 hasta 8,0, siendo el pH 8,0 el seleccionado como óptimo para la extracción de antioxidantes a partir de semilla de mango.

Mylonaki et al. (2008) optimizaron la extracción de compuestos fenólicos a partir de la hoja de olivo, encontrando también que el pH del agua fue el factor que menos afectó al rendimiento de la extracción. Sin embargo, otros autores han descrito que el aumento del pH en las mezclas del agua con disolventes orgánicos, usadas como extractantes, mejoraba la solubilidad de los polifenoles, ya que se favorece la disociación de los grupos de ácidos fenólicos haciendo así que los polifenoles sean más polares (Mylonaki et al., 2008). González-Montelongo et al. (2010b) concluyeron que el contenido en compuestos fenólicos aumentó un 50% cuando el pH del disolvente de extracción (acetona:agua, 50:50 p:v) era superior a 4,0.

3.6. Condiciones óptimas de extracción para maximizar la actividad antioxidante de los extractos de semilla de mango.

Como resultado de todo lo anteriormente expuesto, se pueden establecer unas condiciones de extracción óptimas para la obtención de extractos con alta capacidad antioxidantes y alto contenido en compuestos bioactivos a partir de la semilla de mango (Tabla 6). Al igual que se observó cuando se optimizó el disolvente y la temperatura de extracción (sección 2), se han encontrado importantes discrepancias respecto al contenido en compuestos fenólicos obtenido

en este estudio, en el que se ha realizado la extracción de los antioxidantes en las condiciones óptimas, con los descritos en otros estudios; lo que refuerza el objetivo de esta Tesis Doctoral respecto a la necesidad de optimizar el proceso de extracción.

El proceso de optimización se llevó a cabo tanto para la TE como MAE, sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que el tiempo de extracción óptimo es cero minutos por lo que la MAE no fue necesaria, por lo que los datos aportados son para TE.

Tabla 6. Condiciones de extracción óptimas para la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante a partir de semilla de mango

Condiciones de extracción óptimas para extractos de semilla de mango	
Temperatura (°C)	50
Disolvente	Acetona:agua
Contenido de agua en la mezcla (%)	50
Tiempo (min)	0*
Nº de procesos de extracción	3
Relación peso de semilla:volumen de disolvente (g:ml)	1:30
pH	8,0

*Tiempo de 1 min de homogenización y 20 min de centrifugación

El estudio de correlaciones indicó que el contenido en proantocianidinas estaba fuertemente correlacionado con el atrapamiento de radicales libres ($p = 0,000$; $R > 0,563$) y la inhibición del blanqueamiento del β -caroteno ($p = 0,000$; $R = 0,650$). Sin embargo, la correlación entre el contenido en taninos y la actividad antioxidante fue relativamente débil para ambos casos ($p = 0,000$; $R > 0,423$ para el atrapamiento de radicales y $p = 0,000$; $R = 0,270$ para la inhibición del blanqueamiento del β -caroteno).

4. Optimización de los factores que afectan a la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la piel de mango

De forma similar a como se ha visto en la [sección 3](#), donde se han expuesto los resultados de la optimización del proceso de extracción para la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante a partir de semilla de mango, en la [sección 4](#) se describirá el estudio de los factores de extracción implicados en la obtención de extractos con elevada capacidad antioxidante a partir de piel de mango ([publicación IV](#)). Para la optimización de la extracción se evaluaron dos técnicas: TE y MAE. Los resultados serán abordados explicando el efecto de cada uno de los factores implicados en el proceso de extracción sobre la capacidad de los extractos para atrapar radicales libres o inhibir la peroxidación lipídica, así como en la eficiencia en la extracción compuestos fitoquímicos.

Para la optimización se estableció un diseño experimental CCD (44 experimentos), en el que se fijaron valores mínimos y máximos para los cinco factores que pueden afectar a la extracción: contenido de agua en el extractante, que se varió entre 5 y 95%; relación entre el peso del material vegetal y el volumen de disolvente empleado, que se varió entre 1:10 y 1:50 (w/v); número de pasos del proceso de extracción, que se varió entre 1 y 3; tiempo de extracción, que se varió entre 0 y 120 min y el pH del agua en el extractante, que se varió entre 3 y 8. Dicho diseño contaba con un total de 44 experimentos. Otros factores como el tipo de extractante (etanol:agua), la temperatura de extracción (75 °C), el volumen de extractante (20 ml) y el volumen final de la extracción (60 ml) se mantuvieron constantes.

Cuando se compararon los valores experimentales con los valores, propuestos por el modelo estadístico, se pudo observar que los grupos de valores, para cada ensayo de actividad antioxidante y para cada compuesto fitoquímicos, eran muy similares y que el modelo explicaba entre un 81-94% de la variabilidad observada para los datos experimentales. La validez del modelo también se confirmó mediante la desviación estándar de las estimaciones, medida como desviación estándar de los residuales y con valores entre 0,02 g LEs/100 g MS (proantocianidinas) y 1,1 g TAEs/100 g MS (taninos). El test estadístico de Durbin-

Watson indicó que, debido a que los valores de p obtenidos fueron superiores a 0,050 para todas las determinaciones, no existe sospecha de autocorrelación de los residuales basada en el orden en el que los residuales tienen lugar en el grupo de datos obtenidos.

4.1. Factores que afectan a la capacidad de los extractos de piel de mango de atrapar radicales libres

En las dos técnicas de extracción estudiadas, los factores que más afectaron a la capacidad de los extractos para atrapar radicales libres fueron el contenido de agua en la mezcla extractante (FC 31-51%; $p = 0,000$) y el número de extracciones (FC 28-33%; $p = 0,000$). Al igual que se observó para los extractos de semilla, bajos contenidos de agua en la mezcla extractante, entre el 5 y el 50%, mejoraron la eficiencia de la extracción de compuestos fitoquímicos con actividad antiradicalaria (Figura 9a-b). Con respecto al número de procesos de extracción, se determinó que tres procesos eran óptimos para la extracción, aumentando la capacidad de atrapamiento de los radicales libres entre un 30-60% en relación a cuando se realizaba una sola extracción. El tiempo de extracción fue la tercera variable que tuvo un efecto importante sobre la capacidad antiradicalaria de los extractos; así, cuando los extractos se obtuvieron mediante MAE, el FC fue de 26-30% ($p = 0,000$), mientras que cuando se obtuvieron mediante TE el tiempo de extracción ($p \geq 0,058$) no tuvo un efecto significativo; se observó que, en MAE, un aumento en el tiempo de extracción producía una mejora en la actividad antioxidante de los extractos de piel de mango, estableciéndose un tiempo de 60 min como el óptimo. El impacto de la relación peso de piel:volumen de disolvente sobre la capacidad de los extractos de atrapar los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} fue prácticamente despreciable (FC 3-8%; $p \leq 0,003$) en comparación con el efecto del contenido en agua en el extractante y del número de extracciones para ambas técnicas (TE y MAE). Para obtener extractos ricos en antioxidantes con capacidad para atrapar los radicales libres, la relación peso de piel:volumen del disolvente óptima fue de 1:50 (p:v) (Figura 9a); sin embargo, en MAE la relación 1:30 (p:v) mejoró la capacidad de los extractos para

atrapar el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Figura 9b). El pH del agua en el extractante no afectó a la capacidad de los extractos para atrapar radicales libres ($p > 0,050$).

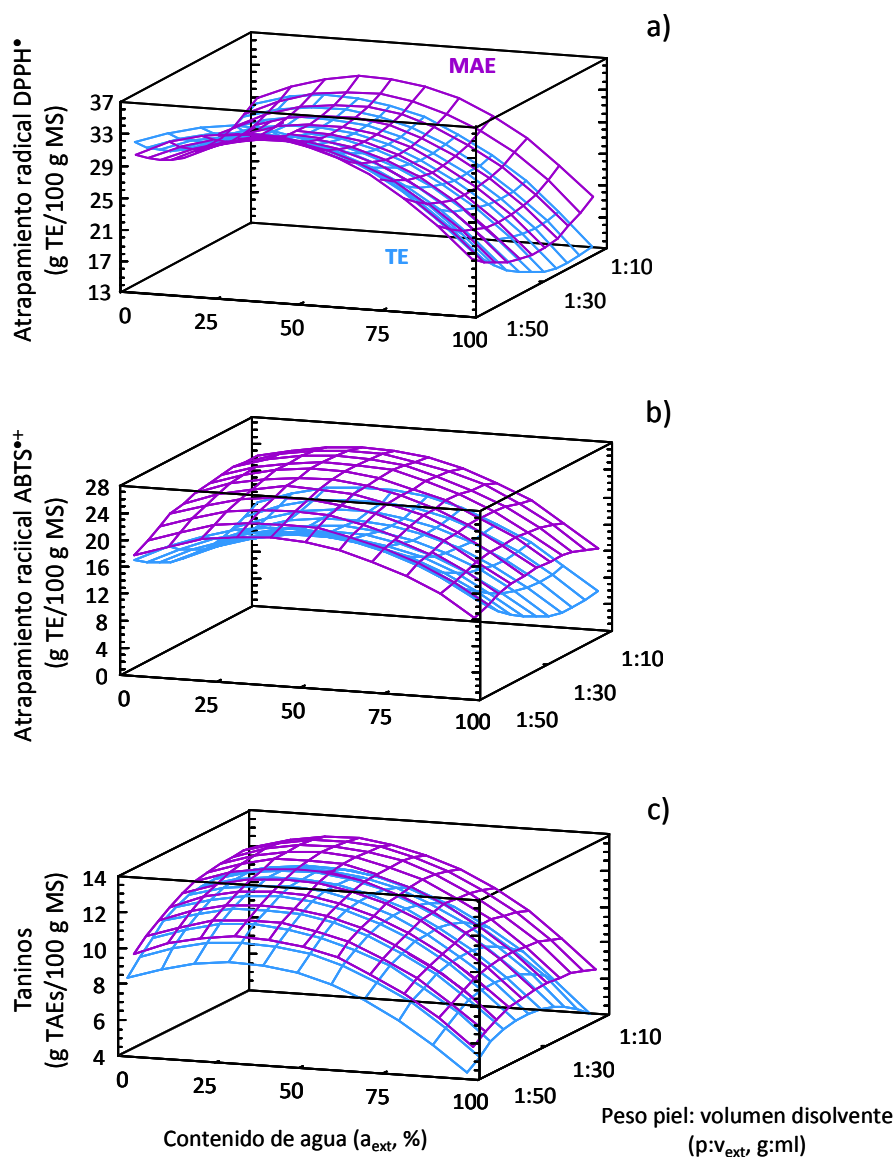


Figura 9. Gráficas Superficie Respuesta obtenidas representando los resultados para el contenido de agua en el extractante (a_{ext} , %) y la relación peso piel:volumen de disolvente ($p:v_{\text{ext}}$, g/ml) para el atrapamiento de los radicales DPPH• (a) y $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (b) y el contenido en taninos (c) en los extractos, cuando se fija el tiempo de extracción en 60 min, el pH del agua a 3,0 y el número de pasos de extracción en 3

En general, los factores de extracción estudiados afectaron de igual manera en las dos técnicas de extracción utilizadas; sin embargo, los extractos obtenidos

usando MAE tenían mayor actividad antioxidante que los obtenidos con TE, en un intervalo comprendido entre 1,2-1,6 veces superior (Figura 9 y Figura 10).

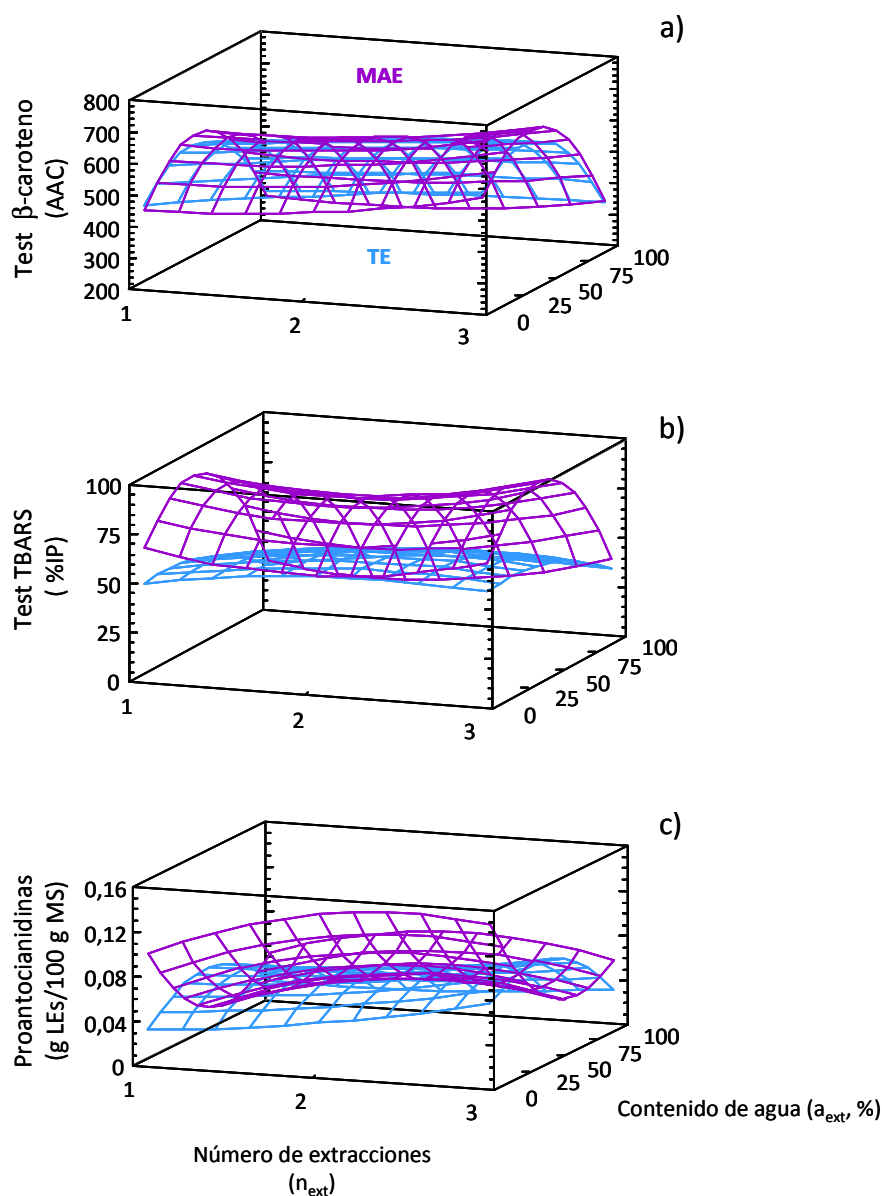


Figura 10. Gráficas Superficie Respuesta obtenidas representando los para el número de procesos de extracción (n_{ext}) y el contenido de agua en el extractante (a_{extr} %) para la inhibición del β -caroteno (a), formación de TBARS (b) y el contenido en proantocianidinas (c) en los extractos, cuando se fija el tiempo de extracción en 60 min, el pH del agua a 5,5 y la relación peso piel:volumen de disolvente ($p:v_{extr}$, g/ml) en 1:30

4.2. Factores que afectan a la capacidad de los extractos de piel de mango para inhibir la peroxidación lipídica

Para las dos técnicas de extracción estudiadas, la relación peso de piel:volumen de disolvente (FC 32-47%, $p = 0,000$) y el contenido de agua en el extractante (FC 19-32%, $p = 0,000$) fueron los factores que más influyeron en la capacidad de los extractos para inhibir la peroxidación lipídica. La capacidad antioxidante aumentó entre un 22 y un 95% cuando la relación peso:volumen disminuyó de 1:50 a 1:10 (p:v), siendo seleccionada la relación 1:10 (p:v) como óptima. Por otra parte se observó que al aumentar la proporción de agua en el extractante, desde el 5 hasta el 50%, la capacidad para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno y la formación de TBARS también aumentaba; sin embargo, contenidos en agua superiores al 50% disminuían la actividad (Figura 10a-b). El tercer factor que afectó de forma importante a la capacidad de los extractos para inhibir la peroxidación lipídica fue el tiempo de extracción ($p \leq 0,006$), aunque tuvo un mayor efecto en los extractos obtenidos mediante MAE (FC 15-22%) que en los obtenidos con TE (FC 2,0-14%). Para ambas técnicas, al aumentar el tiempo de extracción (desde 0 hasta 60 min) se incrementaba la capacidad antioxidante de los extractos. El número de extracciones ($p = 0,000$) afectó ligeramente a la extracción con un FC comprendido entre un 2,6 y un 5,9%; así, cuando el número de extracciones fue de tres, se observó como la capacidad de los extractos obtenidos por ambas técnicas aumentaba ligeramente. Sin embargo, el pH de la extracción no tuvo efecto sobre la capacidad de los extractos de inhibir la peroxidación lipídica.

Los extractos obtenidos con MAE siempre tuvieron mayor capacidad antioxidante que los obtenidos con TE, entre 1,1-3,0 veces superior (Figura 10a-b).

4.3. Factores que afectan al contenido en compuestos bioactivos de los extractos de piel de mango

Los factores que mayor efecto tuvieron en la obtención de extractos con alto contenido en taninos (Figura 9c) fueron el contenido de agua (FC 39-59%, $p = 0,000$) y el número de extracciones (FC 25%, $p = 0,000$). En cuanto al contenido en proantocianidinas (Figura 10c) de los extractos de piel de mango se observó que la

relación peso:volumen del disolvente (FC 30-50%), el contenido de agua en el extractante (FC 10-33%) y el número de extracciones (FC 7-13%) fueron los factores que más influenciaron. El contenido en compuestos fitoquímicos (taninos y proantocianidinas) mejoró al disminuir el contenido de agua en el extractante, siendo el contenido óptimo de agua entre 5 y 50% para ambas técnicas de extracción (Figura 9c y Figura 10c). Cuando se estudió el efecto de la relación peso de piel:volumen del disolvente sobre el contenido de compuestos bioactivos se observó que en los extractos obtenidos por ambas técnicas la disminución en la relación desde 1:50 a 1:10 (p:v) mejoraba el contenido en compuestos bioactivos; por lo tanto, se concluyó que las relaciones entre 1:30 y 1:10 (p:v) podían ser seleccionadas como óptimas (Figura 9c, contenido en taninos). En relación al número de extracciones, se determinó que al incrementar el número de extracciones se aumentaba el contenido en taninos y proantocianidinas entre un 15 y un 50 %, considerando tres extracciones como óptimas (Figura 9c y Figura 10c). El tiempo de extracción no influyó ($p = 0,086$) en la obtención de extractos por TE; no obstante, cuando los extractos fueron obtenidos mediante MAE el efecto del tiempo sobre el contenido en taninos y proantocianidinas fue diferente, de tal manera que tuvo una mayor influencia sobre la extracción de taninos (FC 27%) que sobre la extracción de proantocianidinas (FC 7%). Por lo tanto, para la obtención de extractos ricos en taninos o en proantocianidinas, se determinó que el tiempo óptimo de extracción mediante MAE era de 60 min.

Es importante resaltar que el rendimiento en la extracción de taninos y proantocianidinas fue mayor cuando se usó MAE que cuando se empleó TE entre 1,2-4,5 y 1,3-6 veces, respectivamente (Figura 9c y Figura 10c).

4.4. Condiciones óptimas de extracción para maximizar la actividad antioxidante de los extractos de piel de mango

En la [Tabla 7](#) se describen las condiciones de extracción óptimas establecidas para la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante y alto contenido en compuestos bioactivos a partir de la piel de mango. Se establecieron dos grupos de condiciones óptimas de extracción (A y B) que se diferencian en la relación peso de

piel:volumen de disolvente, ya que la relación 1:10 (p:v) es la óptima para obtener extractos con alta capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y con un alto contenido en compuestos bioactivos y la relación 1:50 (p:v) es la óptima para obtener extractos con alta capacidad de atrapamiento de radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}).

Tabla 7. Condiciones de extracción óptimas para la obtención de extractos con alta capacidad antioxidante a partir de piel de mango

Condiciones de extracción óptimas para extractos de piel de mango	Extracción A	Extracción B
Temperatura (°C)	75	75
Disolvente	Etanol: agua	Etanol: agua
Contenido de agua en la mezcla (%)	50	50
Tiempo (min)	60*	60*
Nº de procesos de extracción	3	3
Relación peso de piel:volumen de disolvente (g:ml)	1:50	1:10
pH del agua en el extractante	3,0	3,0

*Además del tiempo de 1 min de homogenización y 20 min de centrifugación

El estudio de correlaciones reveló que el contenido en taninos de los extractos de piel de mango y la actividad antioxidante estaban fuertemente correlacionados ($p = 0,000$; $R > 0,532$). El contenido en protantocianidinas, en cambio, estaba fuertemente correlacionado con la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica ($p = 0,000$; $R = 0,521$) y relativamente débil correlacionado con la capacidad de atrapar radicales ($p = 0,000$; $R > 0,352$).

Resultados similares a los obtenidos para la piel de mango, en este estudio, se obtuvieron para la obtención de compuestos fenólicos con MAE a partir de *Portulaca oleracea* L. (Zhu et al., 2010) y de residuos de vino (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011) donde el contenido de agua óptimo en el disolvente de extracción fue entre un 10-40%; este contenido en agua aumentaba la eficiencia de la extracción, ya que el agua hidrata el material vegetal permitiendo así un incremento en cuanto a la superficie del área del material vegetal que entra en contacto con el disolvente y en consecuencia una mayor extracción de compuestos.

En cuanto a la relación peso de material vegetal: volumen de disolvente, Zhu et al. (2010) también emplearon la relación 1:50 (p:v) para obtener extractos con una alta capacidad para atrapar radicales libres a partir de *Portulaca oleracea* L. utilizando MAE. Los estudios de Nepote et al. (2005) y Barreto et al. (2008) confirmaron que tres extracciones eran las óptimas para extraer antioxidantes a partir de la cáscara cacahuete y de la piel de mango, respectivamente.

Normalmente MAE requiere un menor tiempo de extracción que TE; sin embargo, en la extracción de antioxidantes a partir de piel de mango en ambas técnicas el tiempo necesario fue similar. Por el contrario, la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fitoquímicos de los extractos obtenidos a partir de la piel de mango con MAE fue mucho mayor que los obtenidos con TE. Este hecho se puede explicar si se tiene en cuenta que la constante dieléctrica del disolvente aumenta al añadir un 50% de agua; esta circunstancia ayuda a una mejor absorción de la energía del microondas cuando lo comparamos con el etanol puro y por lo tanto se produce un incremento de la eficiencia de la extracción (Hemwimon et al., 2007). Además es importante mencionar que en MAE la energía del microondas calienta más rápido el material vegetal que cuando la extracción se hace aplicando calor en un baño de agua, por lo que hay un menor riesgo de degradación térmica, descomposición u oxidación de los compuestos bioactivos de las plantas cuando se utiliza MAE que cuando se utiliza TE (Kaufmann & Christen, 2002; Liazid et al., 2007). Sun et al. (2007) observaron, a través de microfotografías electrónicas de barrido, que la estructura de frambuesa roja después de MAE mostraba una mayor desestructuración que las obtenidas a partir de TE, debido a que la irradiación del microondas produjo la ruptura física de la estructura del material vegetal, lo que permitió una migración directa de los compuestos bioactivos hacia el disolvente de extracción.

Como se mencionó en la [sección 2](#) (optimización del disolvente y la temperatura de extracción) y la [sección 3](#) (optimización de las condiciones de extracción a partir de semilla de mango) se han encontrado discrepancias importantes respecto al contenido en compuestos fenólicos descritos para la piel de

mango en la bibliografía y los datos aportados en la presente Tesis Doctoral, lo que pone de nuevo de manifiesto la necesidad de optimizar el proceso de extracción.

5. Actividad antioxidante, antimicrobiana y contenido en fenoles de los extractos de tres variedades de mango

Una vez determinadas las condiciones más adecuadas para obtener extractos con alta actividad antioxidante y ricos en compuestos fenólicos ([publicación II, III y IV](#)), se evaluó la actividad antioxidante, el contenido en compuestos bioactivos así como la actividad antimicrobiana de extractos de tres variedades de mango: “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3” ([artículo V](#)).

5.1. Contenido en compuestos bioactivos

Tanto la piel como la semilla de mango, de las tres variedades analizadas, presentan cantidades elevadas de fenoles totales, entre 8,5-18 g GAEs/100 g MS ([Tabla 8](#)).

El 89-97% del total de los fenoles contenidos en estos biorresiduos son taninos. En los extractos de piel no se observaron diferencias significativas, en el contenido en compuestos fenólicos y taninos, entre variedades y proceso de extracción; sin embargo, los extractos de semilla obtenidos de las variedades “Sensation” y “Gomera 3” presentaron mayor contenido en fenoles totales que los obtenidos de la variedad “Keitt” ([Tabla 8](#)). En cuanto al contenido en proantocianidinas es importante destacar que los extractos de piel obtenidos con la extracción B (1:10, p:v) presentaron mayor contenido en proantocinidinas que los extractos de piel obtenidos con la extracción A (1:50, p:v) ([Tabla 8](#)), en cuanto a las variedades, la variedad Keitt presentó el menor contenido en proantocianidinas (aproximadamente 2 veces inferior). Sin embargo, en el caso de los extractos de semilla, el contenido en proantocianidinas fue mayor en la variedad “Keitt” (1,3 veces superior) ([Tabla 8](#)).

Tabla 8. Contenido en compuestos fitoquímicos en extractos obtenidos de la piel y semilla de tres variedades mango

Piel	Fenoles totales (g TAEs/100 g)*		Proantocianidinas (mg LEs/100 g)*	
	Proceso Extracción**		Proceso Extracción**	
Variedad	A	B	A	B
“Keitt”	13 ± 3 ^{a/A}	11 ± 1 ^{a/A}	0,081 ± 0,006 ^{b/B}	0,24 ± 0,01 ^{a/B}
“Sensation”	18 ± 1 ^{a/A}	13 ± 3 ^{a/A}	0,16 ± 0,01 ^{b/A}	0,48 ± 0,04 ^{a/A}
“Gomera 3”	16 ± 1 ^{a/A}	13 ± 1 ^{a/A}	0,18 ± 0,01 ^{b/A}	0,46 ± 0,05 ^{a/A}
Semilla				
“Keitt”	8,5 ± 0,1 ^B		0,80 ± 0,09 ^A	
“Sensation”	15 ± 1 ^A		0,60 ± 0,06 ^B	
“Gomera 3”	15 ± 1 ^A		0,59 ± 0,04 ^B	

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,050$) entre los procesos de extracción (a-b) o entre las variedades empleadas para obtener los extractos a partir de piel y semilla de mango (A-B), respectivamente

* TAEs, equivalentes de ácido tánico; LEs, equivalentes de leucoantocianidina

** A, extracción de piel empleando la relación peso piel:volumen disolvente de 1:50 (p:v) y B, con la relación peso piel:volumen disolvente de 1:10 (p:v). El resto del proceso de extracción se realizó siguiendo las conclusiones de los trabajos anteriores (sección 4)

Como ya se ha mencionado anteriormente (sección [Introducción](#)), existen numerosos trabajos en los que se ha descrito el efecto de la variedad del mango, el tipo de biorresiduo, el método de deshidratación, las condiciones y proceso de extracción sobre el perfil de compuestos bioactivos presentes en los extractos obtenidos a partir de piel y semilla de mango, así como en su actividad antioxidante y contenido en fenoles totales (Berardini et al., 2005; Soong & Barlow, 2006; Ribeiro et al., 2008; Khammuang & Sarnthima, 2011; Pitchaon, 2011). Soong & Barlow (2004) analizaron el extracto obtenido de semillas de mango cultivados en Singapur sometidos a diferentes tratamientos de deshidratación (secado en horno convencional a 35 y 105 °C, éstos últimos se volvieron a deshidratar a 140, 160, 180, 200 °C durante 20min) encontraron contenidos diferentes que variaron entre 11,7 y 16 g GAE/100 g MS dependiendo del tratamiento de deshidratación empleado. Abdalla et al. (2007) evaluaron el contenido en fenoles totales presente en las semillas de las variedades “Zebda”, “Balady” y “Succary”, describiendo un contenido de 0,11 g GAEs/100 g MS con un contenido en taninos del 21%. Khammuang &

Sarnthima (2011) describieron contenidos de fenoles totales entre 7,4 g GAE/100 g MS para extractos de semilla de mango de la variedad “Kaen” y 39 g GAE/100 g MS para la variedad “Chok-Anan”, ambas variedades de Tailandia. Pitchaon (2011) detectaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales de extractos de semilla de mango obtenidos por agitación (11,0 g GAE/100 g MS) o por hidrólisis (29 g GAE/100 g MS). Ayala-Zavala et al. (2011) encontraron importantes diferencias entre el contenido en fenoles totales de la piel (7,0 g GAE/ 100 g de Materia Fresca, MF) y la semilla (11,7 g GAE/ 100 g MS) del mango.

No se han encontrado referencias bibliográficas acerca del contenido de proantocianidinas en biorresiduos de mango, por lo que este trabajo es el primero en aportar datos acerca del contenido en estos compuestos en mango, por otra parte, el interés en la cuantificación de estos compuestos se basó en sus conocidas propiedades como agentes antimicrobianos (Patel et al., 2011; Yamaguchi et al., 2011; Sarnoski et al., 2012). El contenido en proantocianidinas de la piel de las variedades estudiadas en esta Tesis Doctoral es mucho menor que el de otros biorresiduos como los del vino (7,9-20 g proantocianidinas/100 g MS) (González-Centeno et al., 2012) o los de la semilla de zarza (68-176 g proantocianidinas/100 g MS) (Xu et al., 2006). Sin embargo, al comparar el contenido en proantocinidinas de los extractos de semilla de piel de mango obtenidos con el proceso de extracción B (1:10, p:v) para cualquiera de las variedades estudiadas en esta Tesis Doctoral (Tabla 8), con los presentados por Kosińska et al. (2012) para extractos de semillas de aguacate de las variedades “Hass” y “Shepard” (0,017 g protanocinidinas/ 100 g MS, para las dos variedades) (), se puede observar que los extractos de la piel [extracción B (1:10, p:v)]y la semilla de mango mayor contenido en proantocianidinas.

5.2. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las tres variedades

En lo que se refiere a la actividad antioxidante mostrada por los extractos se puede decir que los extractos de la semilla “Keitt” mostraron la menor capacidad para atrapar el radical DPPH[•] (Tabla 9). Sin embargo, en el caso de los extractos de

piel, no se observaron diferencias entre las variedades ni entre los procesos de extracción.

La piel y la semilla del mango de las tres variedades estudiadas mostraron mayor capacidad para atrapar el radical DPPH[•] que la piel de mango de la variedad Tommy Atkins (0,12 g of TE/100 g MS) (Berardini et al., 2005) y que la piel de plátano (3,1 g of TE/100 g MS) (González-Montelongo et al., 2010a). Sin embargo, otros extractos procedentes de otros residuos tropicales mostraron una fuerte capacidad de atrapamiento del radical DPPH[•] como el cajá-umbu (*Spondias* sp) (63 g TE/ 100g MS) (Correia et al., 2012).

La capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (valores AAC) de los extractos de piel de mango presentados por la extracción B (1:10, p:v) fueron significativamente superiores a los obtenidos para la extracción A (1:50, p:v) para las tres variedades (Tabla 9).

Tabla 9. Capacidad antioxidante mostrada por extractos obtenidos de la piel y semilla de tres variedades mango

Piel	DPPH [•] (g TE/100 g)*		Inhibición del blanqueamiento β-caroteno (AAC)*	
	Proceso Extracción**		Proceso Extracción**	
Cultivar	A	B	A	B
“Keitt”	43 ± 3 ^{a/A}	47 ± 1 ^{a/A}	361 ± 8 ^{b/C}	587 ± 10 ^{a/B}
“Sensation”	43 ± 8 ^{a/A}	47 ± 2 ^{a/A}	443 ± 12 ^{b/A}	632 ± 28 ^{a/A}
“Gomera 3”	41 ± 8 ^{a/A}	41 ± 9 ^{a/A}	398 ± 6 ^{b/B}	555 ± 24 ^{a/B}
Semilla				
“Keitt”	22 ± 3 ^B		469 ± 6 ^B	
“Sensation”	38 ± 4 ^A		575 ± 5 ^A	
“Gomera 3”	44 ± 5 ^A		589 ± 5 ^A	

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar (n ≥ 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p ≤ 0,050) entre los procesos de extracción (a-b) o entre las variedades empleadas para obtener los extractos a partir de piel y semilla de mango (A-C), respectivamente

TE = capacidad antioxidante equivalente al trolox (g/100 g MS); AAC = Coeficiente Actividad Antioxidante

** A, extracción de piel empleando la relación peso piel:volumen disolvente de 1:50 (p:v) y B, con la relación peso piel:volumen disolvente de 1:10 (p:v). El resto del proceso de extracción se realizó siguiendo las conclusiones de los trabajos anteriores (sección 4)

Los resultados presentados en este estudio están de acuerdo con los obtenidos previamente en los trabajos de optimización del proceso de extracción

de compuestos bioactivos a partir de la piel ([sección 4, publicación IV](#)) donde se concluye que la principal diferencia entre la extracción A y B, es que la extracción B (1:10, p:v) presenta una mayor capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y un mayor contenido en proantocianidinas que la extracción A (1:50, p:v).

Con respecto a las variedades, la variedad “Keitt” fue la que presentó la menor capacidad para inhibir la peroxidación lipídica ([Tabla 9](#)). Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos por otros biorresiduos, se puede decir que los biorresiduos del mango muestran una fuerte capacidad antioxidante si el método de extracción empleado es el adecuado. Por ejemplo, los extractos de piel de plátano presentaron mayor capacidad para inhibir el blanqueamiento del β -caroteno que los extractos de piel de mango de todas las variedades obtenidos con el proceso de extracción A (1:50, p:v), entre 1,2 - 1,4 veces superior. Sin embargo, cuando la extracción es realizada con el proceso de extracción B (1:10, p:v), la piel del mango de las tres variedades evaluadas presentó entre 1,2 - 1,3 veces mayor capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica que la piel de plátano (González-Montelongo et al., 2010a). Por otra parte, en el caso de la semilla de mango sólo el cultivar “Sensation” y “Gomera 3” mostró mayor valor de AAC que la piel del plátano (1,2 veces) (González-Montelongo et al., 2010a).

Los valores de AAC de los extractos de piel de mango obtenidos con la extracción B (1:10, p:v) y los extractos de semilla (variedades “Sensation” y “Gomera 3”) obtenidos en este estudio presentaron valores muy similares a los obtenidos para los antioxidantes sintéticos usados en la industria alimentaria (AAC = 653 para el butilhidroxianisol (BHA), y AAC = 559 para el buthidroxitolueno (BHT)) (Barbosa-Pereira et al., 2013). Por lo tanto, los extractos de piel y semilla de mango pueden ser muy efectivos para proteger al β -caroteno de la oxidación mostrando una eficacia similar a la de los antioxidantes sintéticos BHA y BHT. Resultados similares fueron observados por extractos obtenidos a partir de residuos generados durante la elaboración de cerveza (Barbosa-Pereira et al., 2013).

5.3. Actividad antimicrobiana de los extractos de la tres variedades de mango

En el artículo V, se evaluó la actividad antifúngica de los nueve extractos obtenidos a partir de la piel y la semilla de mango de tres variedades (“Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”) en condiciones óptimas de extracción (secciones 3 y 4) frente a dieciocho especies de levaduras.

Mediante el método de difusión en agar se observó que todos los extractos obtenidos de la piel y la semilla de mango de todas las variedades tenían efecto inhibitorio sobre el crecimiento de todas las levaduras testadas (Tabla 10). Posteriormente, la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima fungicida (MFC) permitieron evaluar la eficacia de cada uno de los extractos empleados.

En general, los valores de MIC para los extractos de semilla fueron inferiores a los obtenidos para los extractos de piel. *P. ohmeri*, *Z. bisporus* y *H. uvarum* (Tabla 10) fueron las especies más sensibles y *D. bruxellensis*, *L. elongisporus* y *S. ludwigii* (Tabla 10) fueron las especies más resistentes a los extractos de piel usados.

El ensayo de MFC fue llevado a cabo para determinar la muerte celular después de realizar el ensayo de MIC. De acuerdo con las concentraciones testadas, la mayoría de las levaduras mostraron diferencias significativas entre los valores de MICs y MFCs, lo que podría indicar que los extractos de mango tienen un efecto fungistático. Sin embargo, sería conveniente poder realizar ensayos a concentraciones más elevadas para poder confirmar definitivamente si el efecto de estos extractos es solamente fungistático.

Table 10. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC) de extractos de piel y de semilla de mango frente a diferentes especies de levaduras

Especies de levaduras	Antifungal activity of mango byproducts extracts (mgGAE/ml)									
	Extractos de piel						Extractos de semilla			
	GA	SA	KA	GB	SB	KB	G	S	K	
<i>Candida bracarensis</i>	MIC	1	1	0.5	1	1	1	0.5	0.5	1
CECT 12000	MFC	10	5	5	10	5	5	5	5	5
<i>Candida glabrata</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1
ATCC 36583	MFC	10	10	10	10	10	10	5	5	>30
<i>Candida nivariensis</i>	MIC	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	0,5	0,1	0,1	0,5
CBS 9983	MFC	10	10	10	10	10	10	5	5	10
<i>Candida parapsilosis</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	5
ATCC 22019	MFC	10	10	5	10	5	5	>30	>30	>30
<i>Dekkera anomala</i>	MIC	1	0,5	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5
ATCC 58985	MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Dekkera bruxellensis</i>	MIC	5	5	5	5	5	5	0,5	0,5	5
ATCC 36234	MFC	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MIC	0,5	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1
CECT 11105	MFC	15	10	10	10	10	10	5	5	10
<i>Lodderomyces longisporus</i>	MIC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MFC	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MIC	0,1	0,5	<0,1	<0,1	0,5	0,5	<0,1	<0,1	<0,1
MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Pichia fermentans</i>	MIC	5	5	1	5	1	1	1	1	5
ATCC 10651	MFC	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Pichia kluyveri</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0,5	1	1
CECT 11023	MFC	10	10	5	10	5	5	10	10	15
<i>Pichia ohmeri</i>	MIC	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
ATCC 46053	MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	MIC	5	5	5	5	5	5	1	0.5	0.5
MFC	10	10	5	10	10	10	10	10	10	10
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	MIC	0,5	<0,1	1	<0,1	0,5	1	<0,1	<0,1	<0,1
MFC	10	10	10	10	10	10	10	5	5	5
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5
MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	MIC	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
MFC	10	10	10	10	10	10	10	5	5	10
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5
MFC	5	10	5	10	10	5	5	5	5	10
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MIC	1	1	5	1	1	5	1	1	5
MFC	10	10	10	10	10	10	10	15	15	15

Extractos de mango de las variedades "Gomera 3" (G), "Sensation" (S) y "Keitt" (K). Los extractos de piel se obtuvieron mediante dos tipo de extracciones, A (1:50, p:v) y B (1:10, p:v) (sección 4)

Actualmente, existen pocos trabajos relacionados con las propiedades antifúngicas de los biorresiduos del mango. Stoilova et al. (2005) observaron mediante ensayos de difusión en agar que la mangiferina obtenida de hojas de mango tenía un ligero efecto antifúngico en contra de *S. cerevisiae*, sin embargo, no se observaron zonas de inhibición para *C. albicans*. Singh et al. (2009) evaluaron el efecto antifúngico de la mangiferina y sus análogos frente a *C. albicans*. Posteriormente, en 2010, Sing et al. (2010) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de pedúnculo del fruto de mango frente a *C. albicans* (MTCC-183) y *Cry. albidus* (MTCC-2661), los valores de MICs fueron 0,08 y 0,31 mg/ ml, respectivamente. Gupta et al. (2010) utilizaron extractos de hojas de mango y de piel frente a *C. albicans* los resultados mostraron unos valores de MICs comprendidos entre 7,5 - 12,5 mg/ ml y 7,5 - 17,5 mg/ ml para las hojas y la piel, respectivamente. Recientemente, El-Gied et al. (2012) demostraron mediante el método de disco difusión la actividad antifúngica de extractos de semillas de mango contra aislados clínicos de *C. albicans*.

La mayoría de los trabajos realizados con mango realizan ensayos con discos de difusión en agar, por lo que no hay datos de MICs excepto los aportados por Singh et al. (2010), en cambio, en el artículo V de la presente Tesis Doctoral se analizó la actividad antifúngica utilizando dos métodos: difusión en agar y microdilución. Los valores de MICs para los extractos de piel y semilla de mango se encontraron entre 0,1-5 mg GAE/ ml, éstos valores son similares a los aportados para otras especies vegetales como los extractos de cáscara de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) testada frente *Z. bailii* y *Z. bisporus* donde los valores de la MICs fueron entre 1 mg/ ml y 10 mg/ ml (Sarnoski et al., 2012). Los extractos de semilla de Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) mostraron una actividad antifúngica similar a las mostrada por los extractos de las semilla de "Sensation" y "Gomera 3" frente a *C. parapsilosis* (MIC: 0,5 mg GAE /ml). Sin embargo, concentraciones superiores a 16 mg/ ml obtenidas a partir de extracto de pulpa fueron infectivas frente a las mismas especies de levaduras (Rangkadilok et al., 2012).

La actividad biológica de extractos de numerosas plantas, frutos y biorresiduos ha sido atribuida a diversos grupos de compuestos fitoquímicos,

especialmente la capacidad antifúngica de extractos naturales se ha relacionado con el contenido en taninos (taninos hidrolizables y proantocianidinas o taninos condensados) (Patel et al., 2011; Yamaguchi et al., 2011; Sarnoski et al., 2012). En el siguiente trabajo ([artículo VI](#)) se hará una identificación de los compuestos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana mostrada por los extractos de la piel y semilla de las tres variedades estudiadas. Para posteriormente buscar una relación mediante un análisis multivariante entre los compuestos identificados y la actividad antioxidante y antimicrobiana mostrada.

6. Identificación de compuestos bioactivos presentes en extractos de piel y semilla de mango obtenidos en condiciones óptimas

En el artículo VI se identificaron los compuestos presentes en los extractos de piel y semilla de mango utilizados en el anterior estudio ([artículo V](#)) para la determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana.

Se describieron un total de treinta compuestos en las tres variedades de mango estudiadas (“Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”). Los perfiles fenólicos encontrados para los extractos de piel desde un punto de vista cualitativo fueron muy similares entre las variedades y entre los tipos de extracción. En el caso de la semilla, el perfil fenólico entre las variedades tampoco mostró diferencias cualitativas. Sin embargo, al comparar el perfil de los extractos de piel con los de semilla se observaron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas.

Los compuestos antioxidantes identificados pertenecían a seis grupos de compuestos fenólicos ([Tabla 11](#)): flavonoides, xantonas, ácido elálgico y derivados, galatos y galotaninos y derivados de benzofenonas.

Un total de diez flavonoides fueron identificados entre los que se encuentran el quercetin 3- O- diglicósido, quercetin 3- O- glucósido (Isoquercitrin), quercetin 3- O- galactósido, quercetin xylósido, quercetin arabinopiranosido, quercetin arabinofuranósido, quercetin 3- O- ramnósido (Quercitrin), quercetin 3- O- rutinósido, ramnetina hexósido hexósido y derivado de la ramnetina. Los flavonoides identificados se presentaron en todos los biorresiduos analizados excepto el quercetin 3- O- diglicósido, quercetin xylósido, quercetin

arabinopiranosido, quercetin arabinofuranosido y ramnetin hexosido que no se encontraron en los extractos de semilla.

Tabla 11. Compuestos identificados en piel y semilla de mango de tres variedades (“Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”)

Compuestos identificados en piel y semilla de mango	Extractos*
Galoil glucosa	KSG
Ácido Gálico	KSG
Teogalin	KSG
Maclurin 3-C-β-D-glucósido	KPB, GP, KS, SS, GS
Di-galoil-glucosa	KP, SPB, GP
Di-galoil-glucosa	KP, SPB, GP
Metil galato	KP, SPB, GP
Maclurin 3-C(2-O-galoil)β-D-glucósido	KP, SPA, GP, KS, SS, GS
Iriflophenone 3-C(2-O-galoil)β-D-glucósido	KP, GP, KS
Maclurin 3-C(2,3-di-O-galloil)β-D-glucósido	KSG
Etil galato	KSG
Mangiferina	KP, SPA, GP, KS, SS, GS
Metil galato éster	KSG
Tetra-O-galoil-glucósido	KSG
Quercetin-3-O-diglicósido	KP, SP, GP
Metil galato éster	KSG
Quercetin-3-O-glucósido (Isoquercitrin)	KSG
Ácido elágico	KSG
Quercetin-3-O-galactósido	KSG
Ácido valoneico dilactona	KSG
Penta-O-galoil-glucósido	KSG
Quercetin xylósido (Quercetin pentósido)	KP, SP, GP
Quercetin arabinopiranosido (Quercetin pentósido)	KP, SP, GP
Quercetin-3-O-ramnósido (Quercitrin)	KP, SP, GP
Quercetin-3-O-rutinósido	KSG
quercetin arabinofuranosido (Quercetin pentósido)	KP, SP, GP
Derivado de la ramnetina	KSG
Etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxibenzoato	KSG
Etil <i>p</i> -trigalato	KP, SPB, GP
Ramnetina hexosido	KP, SP, GP

KSG, extractos de piel y semilla de mango de las tres variedades; KP, GP, SP, extractos de piel de mango de las variedades “Keitt”, “Gomera 3” y “Sensation”, respectivamente; KPB, SPB extractos piel de mango variedad “Keitt” y “Sensation” obtenidos con la extracción B, respectivamente; SPA, extractos piel de mango variedad “Sensation” obtenidos con la extracción A; KS, SS, GS, extractos de semilla de mango de las variedades “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”, respectivamente

Se identificó una única xantona, conocida comúnmente como mangiferina por ser característica del mango. Este compuesto se presentó en todos los extractos de semilla de todas las variedades, en cambio, en los extractos de piel sólo se

encontró en los extractos de “Keitt” y “Gomera 3”, sin embargo, para la variedad “Sensation” sólo se describió en los extractos obtenidos por el método de extracción A (SPA, “*Sensation*” *Peel Extraction A*”).

En el grupo del ácido elágico y derivados, se identificaron dos compuestos, el ácido elágico y ácido valoneico dilactona, los cuales estaban presentes en la piel y semilla de todas variedades de mango empleadas en este trabajo.

Los galatos y galataninos fueron el grupo mayoritario de los compuestos identificados pues contó con un total 13 compuestos entre los que se encontraron el ácido gálico, el metil galato, etil galato, tetra- O- galoil-glucósido, dos isómeros de metil galato éster, penta- O- galoil-glucósido, etil 2,4-dihidróxido-3-(3,4,5-trihidroxibezoilo)oxibenzoato, galoil glucosa, teogalin, dos isómeros de di-galoil-glucosa y etil-*p*-trigalato. Todos estos compuestos se encontraron en la piel y la semilla de mango de las tres variedades analizadas, excepto los dos isómeros de di-galoil-glucosa y etil-*p*-trigalato que no se encontraron en ninguna de las semillas de las tres variedades analizadas. En el caso de la piel, éstos dos compuestos, sólo se identificaron en la variedad “Keitt” y “Gomera 3”, mientras que para la variedad “Sensation” sólo se presentó en los extractos obtenidos con el método de extracción B (SPB, “*Sensation*” *Peel Extraction B*) (Tabla 11).

Los compuestos identificados en este trabajo se han descrito en mango previamente por diferentes autores entre los que destacan los trabajos de Schieber et al. (2003), Berardini et al. (2004), Berardini et al. (2005), Barreto et al. (2008), Ribeiro et al. (2008), Jiang et al. (2010) y Engels et al. (2012), sin embargo, es importante destacar que con este artículo se han aportado compuestos como el galoil glucosa, teogalin, ácido valoneico dilactona, quercetin-3-*O*-rutinósido, etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoilo)oxibenzoato, etil *p*-trigalato, los dos isómeros del di-galoil-glucosa y un derivado de la ramnetina, que hasta el momento no se habían descrito que estaban presentes en el mango, si bien es cierto que estos compuestos han sido descritos en otras plantas, sin embargo, no habían sido encontrados en extractos de mango hasta el momento lo que pone de manifiesto la importancia del sistema de extracción y de la variedad empleada para poder encontrar nuevos compuestos.

En general se observó que los extractos de piel obtenidos a partir de la extracción B presentaron un porcentaje mayor de galatos, galotaninos y benzofenonas que los extractos obtenidos con la extracción A, mientras que el porcentaje de flavonoides, productos del ácido elálgico y xantonas fue menor.

Aunque los extractos de mango han sido previamente descritos como una importante fuente de mangiferina y otras xantonas glicosiladas (Schieber et al., 2003; Ribeiro et al., 2008), los resultados muestran que esta xantona no es el principal componente de los extractos obtenidos a partir de las variedades "Keitt", "Sensation" y "Gomera 3". De hecho, la mangiferina fue la única xantona identificada significativamente (10% "TII, *Total Ion Intensity*", Intensidad Total del Ión) en los extractos de piel de la variedad "Gomera 3" obtenidos a partir de la extracción A (GPA, "*Gomera 3 Peel Extraction A*"), mientras que en los extractos de "Keitt" y "Sensation" su contenido fue menor (inferior 1% TII).

En los extractos de semilla, en general se observó que los galatos y los galotaninos estaban presentes en proporciones importantes, de tal manera que en los extractos de "Sensation" representaron el 86% del total de compuestos, seguidos de los extractos de "Keitt" con un 60% y finalmente los extractos de "Gomera 3" con un 32%. Por otra parte, es importante destacar que en los extractos de semilla no se encontraron la mayoría de flavonoides encontrados en la piel, como el quercetin-3-arabinoglucósido, quercetin pentósidos, quercetin-O-ramnósido y ramnetin hexosido, así como otros grupos de compuestos como la benzofenona iriflofenona 3-C-(2-O-galoil) β -D-glucósido, y los galotaninos y derivados de galatos, isómeros di-galloil-glucosa y etil *p*-trigalato. En cuanto a la mangiferina, ésta se encontró en las tres variedades de semilla, siendo más abundante en "Keitt" (24%) seguido de "Gomera 3" (4%) y "Sensation" (2%).

En general, el penta-O-galoil-glucósido fue el galotanino con mayor peso molecular encontrado en la piel y la semilla de las tres variedades estudiadas, resultados similares encontraron Berardini et al. (2004) y Barreto et al. (2008). El perfil de flavonoides obtenido para la piel y la semilla del mango de las tres variedades utilizadas está de acuerdo con los datos presentes en la literatura para otras variedades de mango (Berardini et al., 2004; Barreto et al., 2008)

La baja presencia de mangiferina en “Keitt”, “Gomera 3” y “Sensation” pone de manifiesto la gran variabilidad que se puede encontrar respecto a este compuesto en el mango. Berardini et al. (2005) demostró como la concentración de mangiferina variaba en diferentes variedades de mango estudiadas desde 0,011 g/kg MS para la variedad “Haden” hasta 1,29 g/kg MS para la variedad “Chok Anan”.

La realización del análisis multivariante permitió establecer las relaciones entre los diferentes biorresiduos analizados (piel y semilla) y los compuestos fenólicos identificados. Los resultados muestran dos PC caracterizados por la composición fenólica de los nueve extractos analizados, el porcentaje de varianza total explicada fue de un 75,14%, siendo un 52,47% explicada por la componente PC1 y un 22,70% por la componente PC2. La componente PC1 está caracterizada por los flavonoides y las benzofenonas mientras que la componente PC2 esta principalmente relacionada con los galatos y los galotaninos.

Los extractos de piel de mango de todas las variedades obtenidos con la extracción A (KPA, GPA y SPA; “Keitt”, “Gomera 3” y “Sensation”, respectivamente) y los extractos de semilla de las variedades “Keitt” (KS) y “Gomera 3” (GS) presentan bajos valores en la componente PC2 lo que está relacionado con un bajo contenido en galatos y galotaninos. Sin embargo, los extractos de piel obtenidos por la extracción B a partir de la variedad “Keitt” (KPB) y a partir de “Sensation” (SPB) tienen altos valores en la componente PC2 lo que está relacionado con la alta presencia de galatos y galotaninos en estos extractos. Sin embargo, los extractos de semilla de “Sensation” (SS) presentan un contenido más balanceado entre los grupos de compuestos. Por otra parte, los extractos de piel obtenidos por la extracción B a partir de la variedad “Gomera 3” (GPB) se caracterizan por su alto contenido en flavonoides y derivados de benzofenonas. En general, podemos decir que estos resultados nos sugieren que las condiciones de extracción A facilitan la obtención de flavonoides y benzofenonas derivados mientras que con las condiciones de extracción B se extraen galatos y galotaninos. Estos datos están de acuerdo con los resultados que se mostrarán posteriormente en el análisis multivariante realizado en la [sección 7](#) donde se busca una relación entre en perfil polifenólico, la actividad antioxidante y la actividad antifúngica.

Finalmente en este trabajo, el CA permitió establecer grupos entre las muestras en función de proximidad y similitud en cuanto a los compuestos identificados en cada una de ellas. De tal manera que se pudieron establecer tres grupos. El Grupo 1 formado por KPA, SPA, GPA, KS y GS; el Grupo 2 que lo constituye GPB y finalmente el Grupo 3 que está integrado por SS, KPB y SPB. Estos resultados sugieren que el perfil polifenólico del cluster denominado como Grupo 1 (KPA, SPA, GPA, KS y GS) es similar entre todos sus integrantes mientras que es diferente a los extractos de piel obtenidos por la extracción B (Grupos 2 y 3). Los resultados también revelaron que el perfil polifenólico del extracto SS fue más similar a los extractos de piel KPB y SPB que los obtenidos con la extracción A. Por lo tanto, estos resultados confirman en este caso, que el efecto del método de extracción tiene mayor influencia en el contenido polifenólico que la variedad y la parte del mango analizada.

7. Relación entre la actividad antioxidante, antifúngica y perfil polifenólico de los extractos de piel y semilla de mango

Con los datos obtenidos del perfil polifenólico (artículo VI), la actividad antioxidante y la actividad antifúngica (artículo V) de los extractos obtenidos a partir de la piel y la semilla de las tres mango variedades de mango se pretendió buscar una relación mediante un análisis multivariante. El PCA generó dos componentes principales, PC1 y PC2 (Figura 11a), con un porcentaje de varianza total explicada de un 62,9 %. La componente PC1 (varianza explicada acumulada 37,5%) estaba muy correlacionada con el atrapamiento del radical DPPH[•] y con los flavonoides, benzofenonas y el ácido elágico, de acuerdo con esto, la componente PC1 está correlacionada con el atrapamiento de radicales, por lo que los compuestos mencionados están relacionados con esta capacidad mostrada por los extractos. La componente PC2 (varianza explicada acumulada 25,4%) estaba correlacionada con el diámetro de la zona de inhibición, la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, el contenido en fenoles totales, taninos, proantocianidinas y fuertemente correlacionado con galatos, galotaninos y mangiferina. Por lo que se puede decir, que la nueva variable PC2 está claramente asociada con la capacidad antifúngica de

los extractos y con la alta capacidad de estos para inhibir la peroxidación lipídica, que a su vez está asociada al contenido en proantocianidinas, galatos, galotaninos y mangiferina. Por lo tanto, los extractos con alta capacidad para inhibir la peroxidación lipídica presentarán importantes propiedades antifúngicas.

Las muestras evaluadas por su actividad antioxidante y antimicrobiana fueron clasificadas atendiendo al nuevo sistema de PC generado obteniéndose tres grupos ([Figura 11b](#)): Grupo 1 formado por KPA, SPA, GPA, KS y GS caracterizado por una baja puntuación en la componente PC2 lo que se relaciona con una baja capacidad antifúngica; el Grupo 2 que lo constituye GPB y lo define una alta capacidad de atrapamiento de radicales y una moderada actividad antifúngica, y finalmente el Grupo 3 que está integrado por SS, KPB y SPB, presentan una alta puntuación en la componente PC2 por lo que tienen un alto contenido en proantocianidinas, alta capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y una alta capacidad antifúngica.

Atendiendo a los resultados obtenidos en este último análisis, los grupos establecidos en función de la actividad antioxidante y antifúngica de los extractos de piel y semilla de tres variedades de mango son los mismos que obtuvimos para los extractos obtenidos del mismo material y variedades cuando se evaluó su perfil polifenólico en el [artículo VI](#), por lo tanto, se puede establecer una relación entre la actividad antioxidante, la actividad antifúngica y el contenido en compuestos fenólicos.

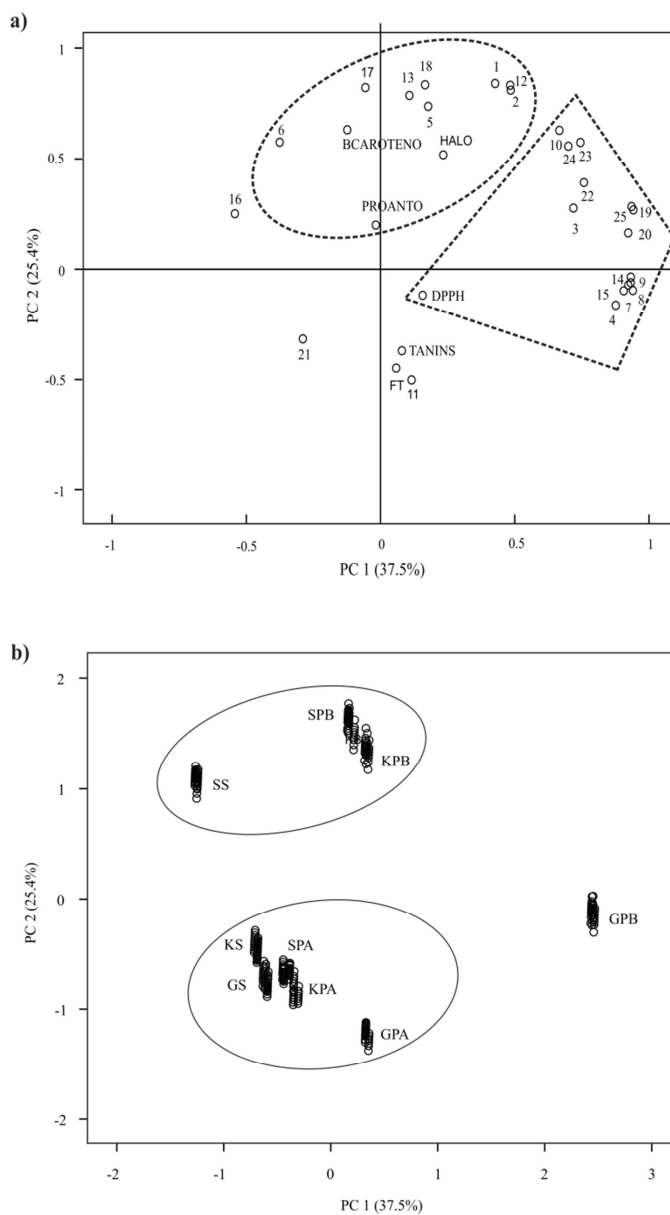


Figura 11. Grafico de distribución de las muestras de piel y semilla de mango (a) y cargas factoriales de las variables (c) en el plano formado por las dos componentes principales. KPB, SPB y GPB, extractos de piel de mango variedad “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3” obtenidos con la extracción B, respectivamente; KPA, SPA y GPA, extractos piel de mango variedad “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3” obtenidos con la extracción A; KS, SS, GS, extractos de semilla de mango de las variedades “Keitt”, “Sensation” y “Gomera 3”, respectivamente. En la figura (a) los números indican el código identificativo de los diferentes compuestos bioactivos identificados; β -CAROTENO, indican los valores de AAC del ensayo del blanqueamiento del β -caroteno; DPPH, indican los valores de TE / 100 g MS del test del DPPH; FT, indican los valores en GAEs/ 100 g MS de fenoles totales; HALO, tamaño en cm de la zona de inhibición. Tres réplicas independientes se realizaron para cada ensayo de determinación de la actividad antioxidante y contenido en fenoles, y dos réplicas independientes para las medidas del tamaño la zona de inhibición

Como se mencionó en la sección 5, la actividad biológica de extractos de numerosas plantas, frutos y biorresiduos ha sido atribuida a diversos grupos de compuestos fitoquímicos, especialmente, la capacidad antifúngica de extractos naturales se ha relacionado con el contenido en taninos (taninos hidrolizables y proantocianidinas o taninos condensados) (Patel et al., 2011; Yamaguchi et al., 2011; Sarnoski et al., 2012). Estudios con extractos ricos en proantocianidinas provenientes de arándanos (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *Candida* spp. y *Cry. neoformans* (Patel et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron con extractos de cáscara de cacahuete al inhibir el crecimiento de *Z. bailii* y *Z. bisporus* (Sarnoski et al., 2012) y con extractos hidroalcohólicos obtenidos de hojas de *Ocotea odorifera* frente a *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Yamaguchi et al., 2011). Yamaguchi et al. (2011) confirmaron por microscopía electrónica de barrido la presencia de daño en las células de levaduras después del tratamiento con elagitaninos aislados de extractos de hojas de *O. odorifera*. Se ha visto, que la acción de las proantocinidinas es similar a la de los taninos hidrolizables que ha sido descrito previamente por Sarnoski et al. (2012) y Patel et al. (2011). Sin embargo, otra posible explicación de la inhibición del crecimiento de las levaduras debido a la acción de las proantocinidinas es por la captación de hierro del medio (Wauters et al., 2001). Se ha comprobado como el ácido tánico es capaz de quelar iones metálicos como el hierro, cobre, y zinc, lo que produce la inhibición del crecimiento de las levaduras ya que estos iones metálicos cumplen importantes funciones en la fisiología de las levaduras (Wauters et al., 2001). Además es importante mencionar que en el caso del mango las principales proantocinidinas que podrían ser responsables de su actividad antifúngica son los galotaninos y/o los elagitaninos., y en este sentido, trabajos previos realizados con galotaninos aislados de semilla de mango describen la capacidad de captación de hierro de estos compuestos como modo de acción antimicrobiana de los mismos (Engels et al., 2009; Engels et al., 2010; Engels et al., 2011).

Bibliografía

-
- Abdalla, A.E.M., Darwish, S., Ayad, E.H.E. & El-Hamahmy, R.M. (2007). Egyptian mango by-product 1: Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103, 1134-1140.
- Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G. & Prasada-Rao, U.J.S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105, 982-988.
- Ajila, C.M. & Prasada Rao, U.J.S. (2013). Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of functional foods*, 5, 444-450.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.
- Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Paseiro-Losada, P. & Cruz, J.M. (2013). Phenolic profile and antioxidant properties of a crude extract obtained from a brewery waste stream. *Food Research International*, 51, 663-669.
- Barreto, J.C., Trevisan, M.T.S., Hull, W.E., Erben, G., de Brito, E.S., Pfundstein, B., Wurtele, G., Spiegelhalder, B. & Owen, R.W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5599-5610.
- Berardini, N., Carle, R. & Schieber, A. (2004). Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2208-2216.
- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. & Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of

- flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1563-1570.
- Consejo de la Unión Europea. (1988). Directiva Comunitaria 88/344/CEE de 13 de junio sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *DOCE*, L.157/28. Bruselas, Bélgica.
- Consejo de la Unión Europea. (1992). Directiva Comunitaria 92/115/CEE de 17 de diciembre por la que se modifica por primera vez la Directiva 88/344/CEE sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *DOCE*, L.409/31. Bruselas, Bélgica.
- Correia, R.T.P., Borges, K.C., Medeiros, M.F. & Genovese, M.I. (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18, 539-547.
- El-Gied, A., Joseph, M., Mahmoud, I., Abdelkareem, A., Al Hakami, A. & Hamid, M. (2012). Antimicrobial activities of seed extracts of mango (*Mangifera indica* L.). *Advance in Microbiology*, 2, 571-576.
- Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y.Y., Carle, R., Gänzle, M.G., & Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7712-7718.
- Engels, C., Gänzle, M.G. & Schieber, A. (2010). Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high speed counter-current chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 775-780.
- Engels, C., Schieber, A. & Gänzle, M.G. (2011). Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2215-2222.

- Engels, C., Gänzle, M.G. & Schieber, A. (2012). Fast LC–MS analysis of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels and effects of methanolysis on their antibacterial activity and iron binding capacity. *Food Research International*, 45, 422-426.
- González, M. & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2, 1842-1866.
- González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C. & Teissedre, P.L. (2012). Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11850-11858.
- González-Montelongo, R., Lobo, M.G. & González, M. (2010a). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, 71, 347-355.
- González-Montelongo, R., Lobo, M.G. & González, M. (2010b). Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119, 1030-1039.
- Gupta, P., Deshmukh, P. & Ravishanker. (2010). Antimicrobial and phytochemical screening of *Mangifera indica* against skin ailments. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 4, 387-392.
- Hemwimon, S., Pavasant, P. & Shotipruk, A. (2007) Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, 44-50.
- Jiang, L.Y., Heb, S., Pan, Y.J. & Sun, C.R. (2010). Bioassay-guided isolation and EPR-assisted antioxidant evaluation of two valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 119, 1285-1292.

- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y. & Dosako, S. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry*, 71, 61-66.
- Kallithraka, S., García-Viguera, C., Bridle, P. & Bakker, J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis*, 6, 265-267.
- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T. & Yamasaki, Y. (2009). Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chemistry*, 113, 964-969.
- Kaufmann, B. & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemistry Analysis*, 13, 105-113.
- Khammuang, S. & Sarnthima, R. (2011). Antioxidant and antibacterial activities of selected varieties of thai mango seed extract. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 24, 37-42.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B. & Dykes, G.A. (2012). Phenolic compounds profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. Peels and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4613-4619.
- Lafka, T.I., Sinanoglou, V. & Lazos, E.S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104, 1206-1214.
- Lapornik, B., Prosek, M. & Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant byproducts using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 1, 214-222.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P., Borroto, B. & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 29, 729-733.

- Larrauri, J.A., Rupérez, P. & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1390-1393.
- Liaqid, A., Palma, M., Brigui, J. & Barroso, C.B. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140, 29-34.
- Maisuthisakul, P. & Gordon, M.H. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*, 117, 332-341.
- Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España. (2011). Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *BOE* nº 208, 94132-94137.
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P. & Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 977-985.
- Nepote, V., Grosso, N.R. & Guzmán, C.A. (2005). Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 33-38.
- Nicoli, M.C., Anese, M. & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 94-100.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (1994). Directiva Comunitaria 94/52/CEE de 7 de diciembre por la que se modifica por segunda vez la Directiva 88/344/CEE sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *DOCE*, L331/10. Bruselas, Bélgica.

- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (1997). Directiva Comunitaria 97/60/CEE de 7 de diciembre por la que se modifica por tercera vez la Directiva 88/344/CEE sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. *DOCE*, L.331/7. Bruselas, Bélgica.
- Patel, K.D., Scarano, F.J., Kondo, M., Hurta, R.A.R. & Neto, C.C. (2011). Proanthocyanidin-rich extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) selectively inhibit the growth of human pathogenic fungi *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12864-12873.
- Pérez-Serradilla, J.A. & Luque de Castro, M.D. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124, 1652-1659.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. & Núñez, M.J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2111-2117.
- Pitchaon, M. (2011). Antioxidant capacity of extracts and fractions from mango (*Mangifera indica* Linn.) seed kernels. *International Food Research Journal*, 18, 523-528.
- Rangkadilok, N., Tongchusak, S., Boonhok, R., Chaiyaroj, S.C., Junyaprasert, V.B., Buajeeb, W., Akanimane, J., Raksasuk, T., Suddhasthira, T. & Satayavivad, J. (2012). In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia*, 83, 545-553.
- Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knödler, M. & Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110, 620-626.

- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000, 657-691.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J. & Núñez, M.J. (2006). Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 59-64.
- Sarnoski, P.J., Boyer, R.R. & O'Keefe, S.F. (2012). Application of proanthocyanidins from peanut skins as a natural yeast inhibitory agent. *Journal of Food Science*, 77, M242-M249.
- Schieber, A., Berardini, N. & Carle, R. (2003). Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5006-5011.
- Shui, G. & Leong, L.P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97, 277-284.
- Singh, S.K., Kumar, Y., Sadish Kumar, S., Sharma, V.K., Dua, K. & Samad, A. (2009). Antimicrobial evaluation of mangiferin analogues. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71, 328-331.
- Singh, M., Khatoon, S., Singh, S., Kumar, V., Singh Rawat, A. & Mehrotra, S. (2010). Antimicrobial screening of ethnobotanically important stem bark of medicinal plants. *Pharmacognosy Research*, 2, 254-257.
- Soong, Y.Y. & Barlow, P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88, 411-417.
- Soong, Y.Y. & Barlow, P.J. (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, 524-530.

- Spigno, G., Tramelli, L. & De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208.
- Stoilova, I., Gargova, S., Stoyanova, A. & Ho, L. (2005). Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. *Herba Polonica*, 51, 37-44.
- Sun, Y., Liao, X., Wang, Z., Hu, X. & Chen, F. (2007). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 225, 511-523.
- Wauters, T., Iserentant, D. & Verachtert, H. (2001). Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to tannic acid is due to iron deprivation. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 290-293.
- Wijngaard, H.H. & Brunton, N. (2010). The optimisation of solid-liquid extraction of antioxidant from apple pomace by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 96, 134-140.
- Wojdylo, A., Figiel, A. & Oszmianski, J. (2009). Effect of drying methods with application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1337-1343.
- Wolfe, K.L. & Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676-1683.
- Xu, G.H., Chen, J.C., Liu, D.H., Zhang, Y.H., Jiang, P. & Ye, X.Q. (2008). Minerals, phenolics compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, 73, C11-C18.
- Xu, Y., Zhang, Y., Chen, M. & Tu, P. (2006). Fatty acids, tocopherols and proanthocyanidins in bramble seeds. *Food Chemistry*, 99, 586-590.

- Yamaguchi, M.U., Garcia, F.P., Cortez, D.A.G. & Nakamura, T.U. (2011). Antifungal effects of ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 507-514.
- Yap, C.F., Ho, C.W., Wan Aida, W.M., Chan, S.W., Lee, C.Y. & Leong, Y.S. (2009). Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, 38, 511-520.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. & Tang, T. (2010). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3, 90-97.

Conclusiones

Conclusiones

- I. El método de deshidratación del material vegetal afectó a la estabilidad de los compuestos bioactivos extraídos y por tanto a la actividad antioxidante de los extractos. En el caso de la piel y la semilla de mango, la liofilización permitió mantener la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos en los extractos respecto al material sin deshidratar, e incluso en determinados casos, como en los extractos de piel en etanol o en los extractos de semilla, la actividad antioxidante de los extractos aumentó respecto a los obtenidos a partir de los biorresiduos sin deshidratar. Por lo tanto, la liofilización se puede considerar como un sistema óptimo de deshidratación que permitió estabilizar los biorresiduos del mango, antes de la extracción, sin que se produjera merma de sus propiedades antioxidantes.
- II. Tanto en los extractos de piel de mango como en los de semilla, los factores de extracción estudiados afectaron de forma importante a la actividad antioxidante y al contenido en compuestos fitoquímicos (taninos y proantocianidinas) de los extractos.
- III. Los factores que tuvieron mayor influencia en el proceso de extracción, a partir de semilla de mango fueron el extractante, la relación peso de semilla:volumen de disolvente y el contenido de agua en la mezcla extractante; en cambio, el número de pasos de extracción, el tiempo, la temperatura y el pH del agua en el extractante afectaron a la extracción en menor medida.
- IV. Las condiciones de extracción óptimas establecidas para la semilla de mango fueron: i) la mezcla acetona:agua (50:50, v:v) como extractante, ii) una temperatura de extracción de 50 °C, iii) tres pasos de extracción, iv) un tiempo de extracción de 0 minutos, v) un pH del agua de 8,0 y vi) una relación de peso:volumen de 1:30 (p:v).
- V. El extractante, el contenido de agua en el mismo, el número de pasos de extracción, la temperatura y el tiempo de extracción fueron los factores

que más influyeron en la capacidad de los extractos de piel de mango para atrapar radicales libres y en la obtención de extractos ricos en taninos; sin embargo, la relación peso de piel:volumen de extractante tuvo un efecto prácticamente despreciable sobre la capacidad antiradicalaria de los extractos. En cambio, la capacidad de los extractos de piel para inhibir la peroxidación lipídica y el contenido en proantocianidinas en los extractos se vio más afectada por la relación peso:volumen, el contenido de agua en el extractante, la temperatura y el tiempo de extracción. En este caso, el número de extracciones tuvo poca influencia en el proceso de extracción. El pH del extractante no afectó a la capacidad antioxidante de la piel de mango.

- VI.** Las condiciones de extracción óptimas establecidas para la piel de mango fueron: i) la mezcla etanol:agua (50:50, v:v) como extractante, ii) una temperatura de extracción de 75 °C, iii) tres pasos de un contenido de agua en la mezcla del disolvente del 50%, número de extracción, iv) un tiempo de extracción de 60 minutos y v) un pH de 3,0. En cuanto a la relación de peso de piel a volumen de extractante fue de 1:50 (p:v) para obtener extractos con alta capacidad de atrapamiento de radicales libres (DPPH[•] y ABTS^{•+}) (*extracción "A"*) y de 1:10 (p:v) para obtener extractos con alta capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y con un alto contenido en compuestos bioactivos (*extracción "B"*).
- VII.** El contenido en compuestos bioactivos de los extractos de piel de mango fue mayor en los extractos obtenidos mediante extracción asistida por microondas que con la extracción tradicional con disolventes.
- VIII.** Los extractos obtenidos a partir de la piel y la semilla de tres variedades de mango ("Keitt", "Sensation" y "Gomera 3"), en condiciones óptimas de extracción, presentaron una elevada actividad antioxidante y antimicrobiana, especialmente los extractos de de semilla de mango de la variedad "Sensation" y los extractos de piel obtenidos con una relación peso:volumen de extractante 1:10 (p:v; *extracción "B"*) de las variedades "Keitt" y "Sensation" que presentaron un alto

contenido en proantocianidinas y alta capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y antifúngica.

- IX. Todos los extractos obtenidos de la piel y la semilla de mango de las tres variedades evaluadas tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de 18 especies de levaduras (*Candida bracarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. parapsilopsis*, *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *P. kluyveri*, *P. ohmeri*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Sacharomycodes ludwigii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. bisporus*, *Z. microellipsoides* and *Z. rouxii*). .
- X. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de semilla fue inferior a la de los extractos de piel, lo que indica que los extractos de semilla fueron más efectivos inhibiendo el crecimiento de las levaduras evaluadas.
- XI. En los extractos de piel y semilla de las tres variedades de mango evaluadas se identificaron un total de treinta compuestos fenólicos, pudiendo clasificarse los mayoritarios en los grupos de los galatos y los galotaninos.
- XII. Las condiciones de extracción utilizadas tienen mayor influencia en el contenido de fenoles de los extractos que la variedad o el biorresiduo de mango evaluado (piel o semilla). Así, los extractos obtenidos con una relación peso de piel:volumen de extractante 1:10 (p:v; extracción "B") presentaron un porcentaje mayor de galatos, galotaninos y benzofenonas que los extractos obtenidos con una relación peso:volumen de 1:50 (p:v; extracción "A"), lo que se tradujo en un aumento de la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (medida como coeficiente de actividad antioxidante mediante el test de blanqueamiento del β -caroteno) de los extractos de piel obtenidos mediante la extracción "B", para las tres variedades estudiadas.
- XIII. Mediante el análisis multivariante se estableció una relación clara entre la actividad antioxidante, la actividad antifúngica y el contenido en

compuestos fenólicos de los extractos obtenidos a partir de piel y semilla de mango, demostrándose que los extractos con un alto contenido en compuestos fenólicos presentan asimismo una alta actividad antioxidante y antifúngica.

Publicaciones y Artículos

**Using drying treatments to stabilise mango peel and seed:
effect on antioxidant activity.**

Dorta, E., Lobo, M. G. & González, M.

*Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of
Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias,
Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain*

LWT - Food Science and Technology, 45, 261-268, 2012



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity

Eva Dorta, M. Gloria Lobo, Mónica González*

Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2010
Received in revised form
21 August 2011
Accepted 30 August 2011

Keywords:

Mangifera indica L. by-products
Freeze-drying
Oven-drying
Lipid peroxidation inhibition
Free radicals scavenging
Phenolic compounds

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of different drying treatments on the antioxidant activity of mango peel and seed. Freeze-drying allowed the peel (when extraction was carried out with ethanol:water) and seed to be stabilised without diminishing their antioxidant activity. In addition, this treatment improved mango peel's antiradical capacity against ABTS^{•+} (in ethanol:water), as well as the capacity of the seed to scavenge free radicals and to inhibit the lipid peroxidation. Oven-drying at 70 °C (with static or forced air) was the treatment that had the most negative effect on the antioxidant capacity of mango peel (when extraction was carried out with ethanol) and seed. Because the effect of drying methods on the phenol and anthocyanin content of mango peel or seed is related to antioxidant activity (with a moderately strong significant correlation, $p < 0.003$), it can be concluded that the phenol content of both materials is largely responsible for their antioxidant activity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The amount of bio-waste produced by the food industry annually in the European Union is estimated at 37,000,000 mT (Commission of the European Communities, 2008). These bio-wastes constitute an environmental problem because they contain large quantities of nitrogen and phosphorous and they also have high water content which makes them susceptible to modification by micro-organisms, with leachate formation and gas emission. The European Union is requiring Member States to reduce organic biodegradable waste in landfills by 65% compared to 1995 levels by 2016 (European Union, 1999) and to take measures ensuring that bio-waste undergoes recovery operations (European Union, 2008).

The main by-products of processing mangos (*Mangifera indica* L.) are the peel and the seed, which represent approximately 35–60% of the fruit (Larrauri, Rupérez, Borroto, & Saura-Calixto, 1996). According to FAO estimates (FAOSTAT database), in 2008 world production of mango, alongside mangosteen and guava, was 34,343,083 mT. Approximately, 0.5% of world mango production is used to obtain derived products; therefore the amount of bio-waste produced by processing industries is estimated to be around 75,000 mT worldwide.

Mango peel and seed have a great deal of antioxidant activity (Ajila, Naidu, Bhat, & Prasada-Rao, 2007a; Maisuthisakul & Gordon, 2009; Soong & Barlow, 2004) because they are rich in bioactive compounds such as phenolic compounds (quercetin, quercetin O-glycosides, isoquercetrin quercetrin galactoside, 3,4-dihydroxy benzoic acid, ellagic acid, mangiferin, isomangiferin, homomangiferin, mangiferin 3-C-6-O-p-hydroxybenzoic acid, xanthenes), carotenoids, tocopherols (α -, γ -) and sterols (β -sitosterol, Δ -avenasterol, campesterol, stigmasterol) (Abdalla, Darwish, Ayad, & El-Hamahmy, 2007; Ajila, Bhat, & Prasada-Rao, 2007b; Ribeiro, Barbosa, Queiroz, Knödler, & Schieber, 2008; Schieber, Berardini, & Carle, 2003).

In mango bio-waste processing, drying may be an essential step to inactivate enzymes responsible for degrading many active compounds and to decrease the rate of microbial growth. However, drying temperature and time affect the activity and stability of bioactive compounds due to chemical and enzymatic degradation, losses by volatilisation and/or thermal decomposition. The effect of drying temperature on the polyphenol content and antioxidant activity of red grape pomace peels was studied by Larrauri, Rupérez, and Saura-Calixto (1997). When drying temperature was 100 and 140 °C, a significant reduction in both total extractable polyphenols and condensed tannins was observed, as well as a decrease of 28 and 50% in the antioxidant activity of the bio-wastes, respectively. Radical scavenging activity and levels of polyphenolic compounds in mulberry leaves air-dried at 60 °C or below were not different

* Corresponding author. Fax: +34 922 476303.
E-mail addresses: glez.glez.monica@gmail.com, mongonza@ull.es (M. González).

from those of freeze-dried leaves, whereas both values in mulberry leaves air-dried at 70 °C and over decreased significantly (Katsube, Tsurunaga, Sugiyama, Furuno, & Yamasaki, 2009). Wolfe and Liu (2003) highlighted that the air-dried and freeze-dried apple peel retained much better their phenols, flavonoids and anthocyanins (with similar contents to those of the fresh apple peel) than the oven-dried samples at 40, 60 or 80 °C.

Therefore, drying conditions play an important role in determining the quality of the final product, especially in terms of its antioxidant activity. The chemical and biochemical changes that take place during this process should be studied; however, no information about the bioactive compounds' stability and antioxidant activity of mango peel or seed was found. The aim of this work was to study the effect of drying methods (freeze-drying and oven-drying with static or forced air) on the polyphenol and chlorophyll content and antioxidant activity of mango peels and seeds. Moreover, statistical methods were used to identify which of the natural antioxidants are related to the antioxidant activity measured (simple lineal correlation) and to ensure that the quality variables analysed can explain how the different drying treatments affect the quality of the mango peel and seed (cluster analysis and principal component analysis).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Mango (*M. indica* L., cv. 'Keitt') was obtained from fields located in La Gomera (Canary Islands, Spain). Fruit (around 20 kg) was harvested at physiological maturity stage (mature-green) and allowed to ripen (full-ripeness or consumption stage) at 18 °C and 80–90% relative humidity. Once the mangos were ripe, the peel or the seed (shell of fibrous endocarp, testa and embryo) was manually separated (peel:mango ratio, $31 \pm 1\%$; seed:mango ratio, $4.2 \pm 2.1\%$), cut into small pieces (0.5×1 cm) and frozen in liquid nitrogen. The mango peel or seed was placed in plastic containers and stored at -80 °C, to decrease the enzyme activity during storage, until the drying treatments were carried out.

2.2. Drying of mango by-products

The mango peel or seed were freeze-dried or oven-dried at 70 °C with static or forced air. Non-dried by-products from mango (fresh, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C) were used as reference to evaluate the effect of drying method on sample quality. The freeze-drying of peels and seeds was carried out in a Christ Alpha 1-4 LSC freeze-dryer (Osterode, Germany). The condenser temperature was -40 °C, the shelf temperature was set at 25 °C and the vacuum was 50 mPa for five days. The oven-dried by-products were placed in a P-Selecta serie 2000 (Barcelona, Spain) or P-Selecta S-374 oven with static or forced air, respectively at 70 °C for 24 h. Each drying trial was performed in triplicate. The dried or non-dried mango peels and seeds were ground to a fine powder by impact grinding with an IKA A11 mill (Staufen im Breisgau, Germany), granulometrically characterised and stored at -20 °C or at -80 °C, respectively, until the extractions were carried out.

To determine water lost during drying, mango peel and seed were weighed before (ca. 100 g) and after the drying processes (in three independent replicates of the drying process). Then, the weight loss was used to calculate the water losses during drying. Chromatic attributes (L^* , h° and C^*) were measured with a Minolta Chroma Meter model CR-300 (Wheeling, IL, USA) colour difference metre, using ca. 30 g of the ground sample placed in a glass flask (in three independent replicates).

2.3. Obtaining extracts with antioxidant activity

The extracts from mango peel or seed were obtained by microwave-assisted extraction (ETHOS 1, Milestone SRL, Sorisole, Italy) for 60 min and at a potency of 500 W. The extraction conditions have been previously optimised (Dorta, González-Montelongo, Lobo, & González, 2009): ethanol:water (1:1, v:v) or ethanol at 75 °C were used as extractants for the peel and acetone:water (1:1, v:v) at 50 °C for the seed. The amount of plant material used in each extraction process varied depending on the water content of the bio-waste (400 mg of dried peel or seed and 1.6 g or 800 mg of non-dried peel or seed, respectively), all of them extracted with 20 ml of extractant. Extracts were centrifuged and stored at -80 °C until the analyses were carried out. Each extraction process was done at least in triplicate (3–9 times).

2.4. Bioactive compound determination

All determinations were made on a Shimadzu UV-visible 160A double-beam spectrophotometer equipped with a Hellma cell (path-length 10^{-2} m).

Phenolic compound content was estimated with the method described by González-Montelongo, Lobo, and González (2010) and the results were expressed as g of gallic acid equivalents (GAEs)/100 g DW mango peel or seed.

The total monomeric anthocyanin content of the mango bio-wastes was measured using a spectrophotometric pH differential protocol (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005). The anthocyanin concentration in the extracts was calculated as follows:

monomeric anthocyanins (mg/l)

$$= \left[(A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \right] \cdot \text{MW} \cdot \frac{1000}{\epsilon \cdot l}$$

where A is absorbance, MW is molecular weight for cyanidin 3-glucoside (449.2 g/mol), ϵ is the molar extinction coefficient of cyanidin 3-glucoside (26,900 l/mol/cm) and l is path-length (cm). The amount of anthocyanin in the plant material was expressed as mg cyanidin 3-glucoside equivalents/100 g DW.

Chlorophyll determination was done at two characteristics wavelengths, 647 and 664 nm, which are the maximum absorption wavelengths for chlorophyll b and chlorophyll a, respectively (Cubas, Lobo, & González, 2008). To increase the detection limit, both in the anthocyanin and chlorophyll determination, the mango peel and seed extracts were obtained from 2.0 g of dried by-product or from 4.0 or 8.0 g of non-dried peel or seed, all of them extracted with 20 ml of extractant. Calibration graphs were obtained by using multiple linear regression and the results were expressed as mg/100 g DW mango peel or seed.

2.5. Extract yield determination

The different extracts obtained were evaporated to dryness in a vacuum Heto VR-1 evaporator (Allerod, Denmark) at 40 °C. The extract yield was defined as the amount of dried extract (g) obtained from 100 g of DW mango by-product.

2.6. Extract antioxidant activity

The antioxidant activity (understood as the capacity of antioxidants to inhibit or prevent the oxidation of different molecules by being oxidised themselves) of the extracts were evaluated by using different methods to obtain information about their activity during different stages of the oxidation reaction: by their capacity to inhibit lipid peroxidation (the antioxidants terminate chain

reactions of fat oxidation); or by their antiradical capacity (the antioxidants scavenge free radicals generated in the chain reaction).

The β -carotene bleaching method is based on the capacity of antioxidants to decrease oxidative losses of β -carotene in a β -carotene/linoleic acid system (González-Montelongo et al., 2010; Miller, 1971). The antioxidant activity was expressed as antioxidant activity coefficient (AAC). The capacity of the bio-wastes to react with secondary oxidation products that were formed in the advanced stages of this reaction was evaluated by using the modified assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) described by González-Montelongo et al. (2010) and expressed as inhibition ratio (IP, %).

The capacity to scavenge the DPPH^{*} radical was monitored according to a slightly modified version of the method used by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) at 515 nm after 15 min. The scavenging activity against the ABTS^{•+} radical was determined by a method (Arnao, Cano, & Acosta, 2001) based on enzymatic generation of the radical by reaction of the ABTS with the horseradish peroxidase in sodium phosphate buffer pH 7.5, in the presence of hydrogen peroxide. Results were expressed as g of TE or AE (trolox or ascorbic acid equivalent antioxidant capacity, respectively)/100 g mango bio-waste on a dry matter basis (DW) and as scavenging percentage (antioxidant activity AA, %) (González-Montelongo et al., 2010).

2.7. Statistical analysis

Data analysis was carried out with the Statgraphics-Plus software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA). Grubbs' test was applied to detect outliers in the data set and analysis of variance to evaluate the effect of the different drying methods on antioxidant activity, extraction yield and bioactive compound content in mango peel and seed. Fisher's Least-Significant-Difference test, at the 5% significance level, was applied to experimental results to assess intra-pair significant differences. Simple linear correlation analysis was used to measure the correlation between the extract yield or the bioactive compounds and the antioxidant activity of the bio-wastes. Two multivariate techniques were used to characterise the quality of mango peel and seed dried by using different treatments on the basis of their antioxidant activity and their bioactive content: cluster analysis (CA), selecting the Euclidean distance as similarity measurement and Ward's method as amalgamation rule, and principal component analysis (PCA) with all variables being mean centred and scaled to unit variance prior to analysis.

3. Results and discussion

The water lost by the seed, during drying, was similar for all the evaluated treatments. However, in peel, there were significant differences between drying treatments, showing the oven-dried peel a higher water loss than the freeze-dried (Table 1).

The evaluation of the peel or seed colour enabled to distinguish the influence of the drying treatment on some quality characteristics of these dried bio-wastes when compared to non-dried material; moreover the colour modification of the plant material could be related to a modification of the bioactive compounds contained in it. Drying treatments changed peel or seed colour: freeze-dried peel had the highest lightness and the peel dried in a static-air oven the lowest chromaticity. The highest hue angle was found for fresh peel (non-dried). In the case of seed, the freeze-dried one showed highest lightness and hue angle and lowest chromaticity that the oven-dried seed and non-dried, treatments which affected to a lesser extent seed colour.

Table 1

Effect of the method used to dry the mango peel and seed on the water lost during the drying and on the colour of these bio-wastes. Mango peel and seed were dehydrated by using three different methods: freeze-drying (FD) and oven-drying at 70 °C with static air (OS) or with forced air (OF). Non-dried (ND) bio-wastes were used as a control.

Drying treatments	W (%)	L	H	C
Peel				
ND	—	50 ± 1 ^d	86 ± 2 ^a	26 ± 2 ^a
FD	71 ± 2 ^b	64 ± 1 ^a	77 ± 1 ^c	24 ± 1 ^b
OS	74 ± 2 ^a	53 ± 1 ^b	75 ± 2 ^d	24 ± 2 ^{ab}
OF	72 ± 5 ^a	52 ± 1 ^c	79 ± 1 ^b	19 ± 1 ^c
Seed				
ND	—	65 ± 1 ^d	89 ± 1 ^b	19 ± 1 ^a
FD	51 ± 6 ^a	76 ± 1 ^a	91 ± 1 ^a	14 ± 1 ^d
OS	47 ± 1 ^a	72 ± 1 ^b	87 ± 1 ^c	18 ± 1 ^b
OF	54 ± 4 ^a	69 ± 1 ^c	84 ± 1 ^d	16 ± 1 ^c

Values are the mean ± standard deviation of at least 3 determinations. Different letters (a–d) denote significant differences ($p < 0.050$) between drying treatments. W, Water lost; L, Lightness; H, Hue angle; C, Chromaticity.

3.1. Effect of drying method on the extract yield and bioactive compound

The drying treatment influenced the extraction yield in peel and seed, for any extraction solvent, improving in all cases over 1.5–4.0 times the yield obtained for the non-dried bio-waste (Table 2). In peel as well in seed, the extraction yield was highest for the freeze-dried by-product. Therefore, the drying treatment may cause an enhancement of the extractability of different compounds.

Regarding the content of bioactive compounds, responsible for the antioxidant activity of peel or seed, considerable amounts of phenolic compounds were detected, being their content higher in peel than in seed; however, anthocyanin compounds and chlorophylls were only detected in peel (Table 2). In the extracts obtained from peel with ethanol:water, the total phenol content was equal in all drying treatments to that of non-dried peel. On the other hand, freeze-drying and oven-drying with forced air led to an increase (1.6 times) in anthocyanin content compared to non-dried peel. Drying treatments also favoured the chlorophyll *a* and total chlorophyll extraction from mango peel (Table 2), possibly because the water removal from plant material favours the extraction of these liposoluble compounds. Peel drying induced a loss of phenolic compounds in ethanolic extracts; therefore, those obtained from oven-dried peel had the lower content: around 25–40% of the content of non-dried material and 50% of that of freeze-dried peel. However, anthocyanin or chlorophyll content was greater in freeze-dried or oven-dried (with static air) peel extracts, respectively.

The content of phenolic compounds in the freeze-dried mango seed was higher (1.2–2.1 times) than that of the other treatments.

3.2. Effect of drying method on the capacity of mango peel or seed to inhibit lipid peroxidation and scavenge free radicals

The capacity of mango peel to protect lipids from oxidation (Fig. 1), in the TBARS test as well as in the β -carotene bleaching assay, and to scavenge the DPPH^{*} free radical (Table 3) was not affected by the drying treatment compared to non-dried material, for extracts obtained with ethanol:water. However, the extracts obtained with ethanol, from mango peel freeze-dried or dried in a static-air oven showed higher scavenging capacity against ABTS^{•+} radical (around 1.5 times higher) than the non-dried peel (Table 3). When the extraction was done with ethanol, peel drying (freeze- and oven-drying) minimised the capacity to inhibit lipid peroxidation (Fig. 1) and to scavenge DPPH^{*} and ABTS^{•+} free radicals (Table 3). In both cases, the treatment that had the most negative

Table 2

Total phenolic compound, anthocyanin compound and chlorophyll content of mango peel and seed. Mango peel and seed were dehydrated by using three different methods: freeze-drying (FD) and oven-drying at 70 °C with static air (OS) or with forced air (OF). Non-dried (ND) bio-wastes were used as a control.

Drying treatment	Extract yield (g/100 g DW)	Phenolics ^e	Anthocyanins ^f (mg/100 g DW)	Chlorophyll <i>a</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Total chlorophyll
Peel; extractant, ethanol:water						
ND	5.9 ± 1.4 ^{c/A}	7.7 ± 0.5 ^{a/B}	1.5 ± 0.2 ^{b/A}	0.31 ± 0.17 ^{c/B}	1.0 ± 0.6 ^{b/B}	1.3 ± 0.7 ^{b/B}
FD	24 ± 1 ^{a/A}	9.2 ± 0.5 ^{a/A}	2.6 ± 0.4 ^{a/A}	0.72 ± 0.10 ^{b/c/B}	2.6 ± 0.6 ^{a/A}	3.3 ± 0.7 ^{a/B}
OS	20 ± 1 ^{b/A}	8.5 ± 0.7 ^{a/A}	1.5 ± 0.1 ^{b/A}	0.83 ± 0.23 ^{b/B}	3.0 ± 0.8 ^{a/B}	3.8 ± 1.0 ^{a/B}
OF	20 ± 1 ^{b/A}	7.9 ± 0.5 ^{a/A}	2.2 ± 0.4 ^{a/A}	3.8 ± 0.4 ^{a/B}	0.86 ± 0.10 ^{b/B}	4.6 ± 0.5 ^{a/B}
Peel; extractant, ethanol						
ND	6.0 ± 0.3 ^{c/A}	13 ± 1 ^{a/A}	1.9 ± 0.3 ^{b/A}	3.6 ± 1.0 ^{d/A}	3.5 ± 1.0 ^{b/A}	7.1 ± 0.7 ^{c/A}
FD	16 ± 1 ^{a/B}	9.8 ± 0.3 ^{b/A}	3.3 ± 0.1 ^{a/A}	6.3 ± 0.6 ^{c/A}	3.3 ± 0.9 ^{b/A}	9.6 ± 0.7 ^{c/A}
OS	14 ± 1 ^{b/B}	4.6 ± 0.2 ^{c/B}	1.6 ± 0.2 ^{b/A}	15 ± 1 ^{a/A}	6.7 ± 1.4 ^{a/A}	21 ± 2 ^{a/A}
OF	14 ± 1 ^{b/B}	4.6 ± 0.3 ^{c/B}	2.0 ± 0.2 ^{b/A}	10 ± 2 ^{b/A}	3.0 ± 0.9 ^{b/A}	13 ± 3 ^{b/A}
Seed; extractant, acetone:water						
ND	4.0 ± 0.4 ^d	3.8 ± 0.1 ^c	–	–	–	–
FD	12 ± 1 ^a	7.4 ± 0.4 ^a	–	–	–	–
OS	7.7 ± 0.4 ^b	6.0 ± 0.5 ^b	–	–	–	–
OF	5.3 ± 0.6 ^c	3.5 ± 0.3 ^c	–	–	–	–

Values are the mean ± standard deviation of at least 3 determinations; n.c., non-quantifiable. Different lower or upper case letters denote significant differences ($p < 0.050$) between drying treatments (a–d) or between extraction solvents used to extract the peel (A–B), respectively.

^e GAEs, gallic acid equivalents.

^f cyanidin 3-glucoside equivalents.

effect on the antioxidant capacity was oven-drying. Moreover, the capacity to scavenge radicals and prevent TBARS formation of the extracts obtained from dried peel, with ethanol:water, was better than the capacity of the extracts obtained with ethanol.

Freeze-drying improved the seed capacity to prevent the bleaching of β -carotene in carotene/linoleic acid mixtures (Fig. 1) and to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals (Table 3), compared to non-dried seed. Thus, the antioxidant capacity of freeze-dried seed

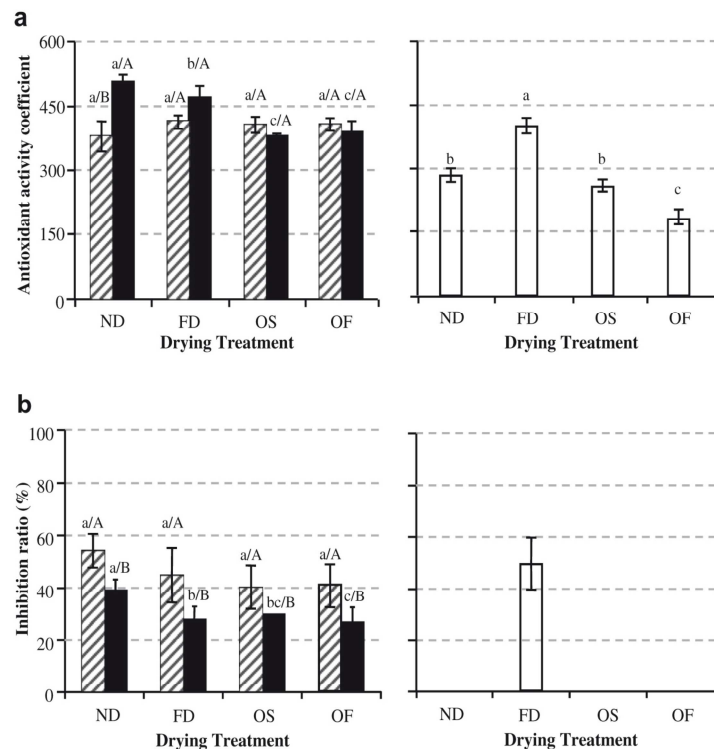


Fig. 1. Effect of drying treatments on the capacity of mango peel and seed to inhibit lipid peroxidation. The inhibition of the lipid peroxidation was measured by using the β -carotene bleaching (a) and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (b) assays. Striped bars represent peel extracts obtained with ethanol:water; black bars represent peel extracts obtained with ethanol; and white bars represent seed extracts obtained with acetone:water. Mango peel and seed were dehydrated by freeze-drying (FD) and oven-drying at 70 °C with static air (OS) or with forced air (OF). Non-dried (ND) bio-wastes were used as a control. Each process was done in triplicate. Different lower or upper case letters denote significant differences ($p < 0.050$) between drying treatments (a–c) or between extraction solvents used to extract the peel (A–B), respectively.

Table 3

Effect of drying method on the capacity of mango peel or seed to scavenge free radicals. Mango peel and seed were dehydrated by using three different methods: freeze-drying (FD) and oven-drying at 70 °C with static air (OS) or with forced air (OF). Non-dried (ND) bio-wastes were used as a control.

Drying treatment	DPPH* (g/100 g DW)		ABTS*+ (g/100 g DW)	
	TE	AE	TE	AE
Peel; extractant, ethanol:water				
ND	56 ± 9 ^{a/A}	41 ± 7 ^{a/A}	25 ± 3 ^{b/A}	28 ± 2 ^{b/A}
FD	48 ± 1 ^{a/A}	35 ± 1 ^{a/A}	37 ± 4 ^{a/A}	38 ± 4 ^{a/A}
OS	44 ± 3 ^{a/A}	32 ± 2 ^{a/A}	39 ± 2 ^{a/A}	39 ± 1 ^{a/A}
OF	49 ± 4 ^{a/A}	36 ± 3 ^{a/A}	34 ± 2 ^{a/A}	34 ± 1 ^{a/A}
Peel; extractant, ethanol				
ND	33 ± 3 ^{a/B}	26 ± 2 ^{a/B}	27 ± 2 ^{a/A}	24 ± 1 ^{a/A}
FD	22 ± 1 ^{b/B}	17 ± 1 ^{b/B}	22 ± 1 ^{b/B}	19 ± 1 ^{b/B}
OS	12 ± 1 ^{c/B}	8.9 ± 0.9 ^{c/B}	11 ± 1 ^{c/B}	9.7 ± 0.6 ^{c/B}
OF	11 ± 1 ^{c/B}	8.9 ± 0.4 ^{c/B}	12 ± 1 ^{c/B}	10 ± 1 ^{c/B}
Seed; extractant, acetone:water				
ND	18 ± 1 ^b	18 ± 1 ^b	14 ± 1 ^b	13 ± 1 ^b
FD	34 ± 2 ^a	34 ± 2 ^a	32 ± 2 ^a	30 ± 2 ^a
OS	14 ± 1 ^c	14 ± 1 ^c	14 ± 1 ^b	13 ± 1 ^b
OF	7.8 ± 0.9 ^d	7.8 ± 0.9 ^d	8.6 ± 1.1 ^c	8.2 ± 1.0 ^c

Values are the mean ± standard deviation of at least 3 determinations. Different lower or upper case letters denote significant differences ($p < 0.050$) between drying treatments (a–d) or between extraction solvents used to extract the peel (A–B), respectively. TE or AE, trolox or ascorbic acid equivalent antioxidant capacity.

was 1.5–2.5 times higher than that of non-dried seed or dried in a static-air oven and 2.0–4.5 times higher than that of seed dried in a forced-air oven. However, oven-drying with forced air decreased the antioxidant activity of the seed compared to non-dried (Table 3). Only the freeze-dried seed showed capacity to prevent the TBARS formation (Fig. 1).

The differences in the extract yield of dried and non-dried peel that were described were not correlated with the changes that took place in antioxidant activity; consequently, it is possible that some substances without antioxidant activity are co-extracted from mango peel. On the other hand, the increase in the yield of dried seed was correlated with an increase in the antioxidant activity of the extracts obtained from dried material.

Because the effect of drying methods on the phenol content of mango peel and seed seems to be related to its effect on antioxidant activity, it can therefore be concluded that the phenol content of both materials is largely responsible for their antioxidant activity.

The reduced levels of the polyphenolic compounds found in ethanolic extracts obtained from oven-dried mango peel correlated well to the antioxidant activity, an indication that the decrease of antioxidant activity resulted from the degradation of phenolic compounds at high temperatures, due to chemical, enzymatic or thermal decomposition (Nicoli, Anese, & Parpinel, 1999). At high temperatures bioactive compounds with antioxidant activity can react with other components of the plant material, thus impeding extraction. Moreover, in forced-air drying ovens, phytochemical compounds can oxidise because the plant material has greater contact with oxygen. Larrauri et al. (1997) did not notice differences in antioxidant activity between freeze-dried grape peel and dried at 60 °C in a forced-air oven; however, when drying temperature increased (100 or 140 °C) a decrease of 28 and 50%, respectively in the antioxidant activity of the samples was observed. Moreover, polyphenol content diminished when oven-drying temperature increased. This behaviour was accompanied by a loss in lightness and hue angle, compared to freeze-dried grape peel. Wojdylo, Figiel, and Oszmianski (2009) highlighted that, in general, the capacity to scavenge the DPPH* and ABTS*+ radicals and the phenolic and anthocyanin content was higher in freeze-dried strawberry than in convective-dried (70 °C, air velocity 1 m/s) or vacuum-dried (50 °C, 100 Pa). Higashi-Okai, Kamimoto, Yoshioka,

and Okai (2002) found that extracts from dried peels of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcov.) had stronger antioxidant activity than those obtained from fresh peel. Extracts from dry heat-treated *Tamarindus indica* seed coat exhibited higher antioxidant activity (scavenging activity and inhibition of peroxidation) than extracts obtained from raw samples (Siddhuraju, 2007). In mulberry leaves, Katsube et al. (2009) established that the DPPH* radical scavenging activity and the phenolic compounds in plant material air-dried at 40 or 60 °C were not significantly different from those of freeze-dried leaves; however, both values decreased significantly in leaves air-dried at 70 °C. Freeze-dried or air-dried apple peel (Wolfe & Liu, 2003) also had a phenol and flavonoid content similar to non-dried peel (500–400 mg GAEs/100 g and 300 mg catequin equivalents/100 g, respectively). However, in the peel that was oven-dried in a mechanical convection oven, at temperatures between 40 and 80 °C, the phenol and flavonoid content was 1.5 times lower. Piga, Del Caro, and Corda (2003) and Piga et al. (2009) established that the plum and peach drying in air-flow cabinet, at temperatures between 55 and 85 °C, reduced polyphenol, anthocyanin and ascorbic acid content compared to fresh fruit. In all cases, the lower amounts of bioactive compound content on the vegetable samples, as a consequence of drying treatment, were attributed to thermal and oxidative degradation of these compounds.

The freeze-dried seed contained significantly higher phenol content than the fresh seed and exhibited higher antioxidant activity. In recent studies, it has been established that plant material stabilisation by drying not only favours its conservation but improves the antioxidant activity of the extracts and, in some cases, the bioactive compound content. Therefore, Wojdylo et al. (2009) compared four methods to dehydrate strawberry fruits: freeze-drying, convection- or vacuum-drying and vacuum-microwave drying. Freeze-drying improved the content of some phenols, such as kaempferol 3-O-glycoside and (+)-catechin in 'Elsanta' variety and of cyanidin 3-O-glucoside in 'Kent', around 1.3 times compared to non-dried strawberry. The phenolic compound content of the freeze-dried mulberry leaves (Katsube et al., 2009) and the anthocyanin content of the freeze-dried apple peel (Wolfe & Liu, 2003) was much higher than the content of the non-dried material. This behaviour may be due to the fact that a large percentage of phenolic compounds are bound to cellular structures and drying treatments release bound phytochemicals from the matrix to make them more accessible in extraction. Another possible explanation is that the polyphenols in an intermediate state of oxidation can exhibit higher radical scavenging efficiency than the non-oxidised ones, although, a subsequent loss in the antioxidant properties has been found for advanced enzymatic oxidation steps (Nicoli et al., 1999).

3.3. Correlations and multivariate statistical analysis

With all the data obtained for the different conditions evaluated ($n = 36$), statistical analysis based on regression lines was carried out in order to analyse the complex relationship between the extract yield or the phytochemical compounds and their antioxidant capacity. The correlation coefficients indicated a moderately strong relationship ($p = 0.000$) between the total extractable compounds and the capacity of the bio-wastes to scavenge ABTS*+ radicals ($r > 0.600$) and the content of anthocyanin compound ($r = 0.629$) and a relatively weak relationship with the capacity to scavenge DPPH* radicals ($r = 0.363$, $p = 0.017$) and the inhibition of TBARS formation ($r = 0.451$, $p = 0.006$). The correlations between antioxidant activity and the extract yield or the phytochemical compounds illustrate that could exist other non-phenolic compounds in the extracts that affect the ability to prevent lipid peroxidation and to scavenge free radicals, probably fibre which

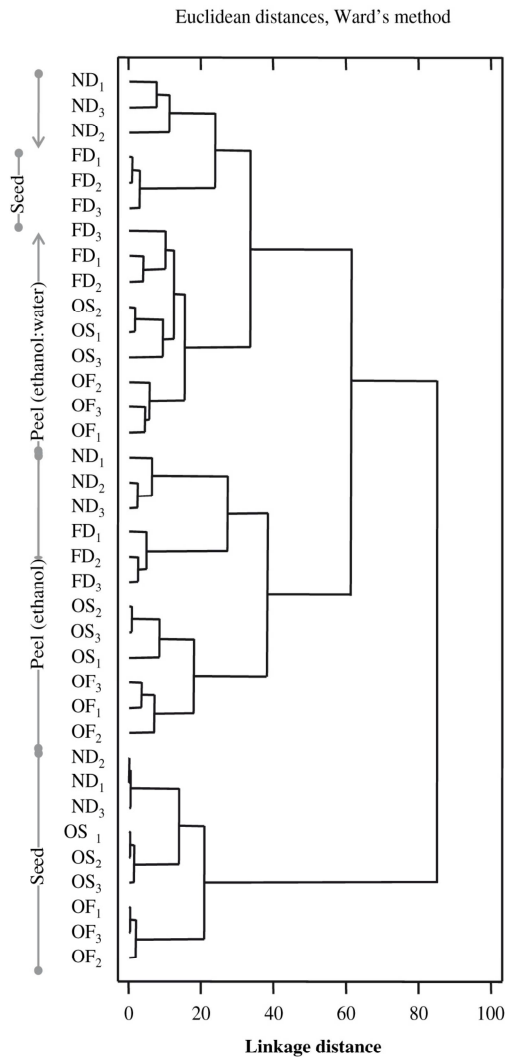


Fig. 2. Dendrogram resulting from a cluster analysis selecting the Euclidean distance as similarity measurement and Ward's method as amalgamation rule, applied to all mango peel and seed studied. Mango peel and seed were dehydrated by freeze-drying (FD) and oven-drying at 70 °C with static air (OS) or with forced air (OF). Non-dried (ND) bio-wastes were used as a control. Three independent replicates of each treatment were analysed: subscripts indicate the number of the sub-sample.

antioxidant capacity has been previously reported (Larrauri et al., 1996, 1997).

A moderately strong significant correlation ($p = 0.000$) also existed between the phenolic compound content and the antiradical capacity of the bio-wastes ($r > 0.585$ for DPPH* and $r > 0.658$ for ABTS⁺ radicals) and between phenols and the capacity to inhibit lipid peroxidation ($r = 0.802$ for β -carotene bleaching and $r = 0.591$ for TBARS tests). The relationship between anthocyanin compounds and the inhibition of the β -carotene bleaching and the TBARS formation was also moderately strong ($r = 0.703$, $p = 0.000$ and $r = 0.528$, $p = 0.002$, respectively) and between anthocyanin

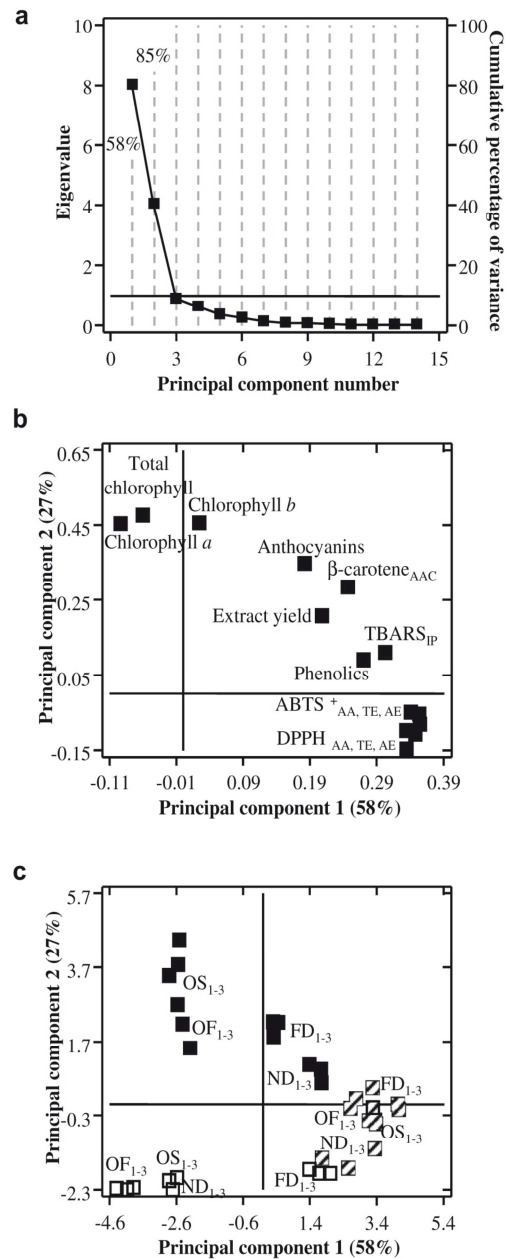


Fig. 3. Score plot of the principal components (a) and distribution of samples of mango peel and seed (b) and plot of variable loadings (c) on the plane formed by the first two principal components, where striped bars represent peel extracts obtained with ethanol:water; black bars represent peel extracts obtained with ethanol; and white bars represent seed extracts obtained with acetone:water. Mango peel and seed were dehydrated by freeze-drying (FD) and oven-drying at 70 °C with static air (OS) or with forced air (OF). Non-dried (ND) bio-wastes were used as a control. The antioxidant activity was expressed as: AAC, antioxidant activity coefficient; IP, inhibition ratio (%); AA, scavenging percentage (%); TE or AE, trolox or ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (g/100 g DW). Three independent replicates of each treatment were analysed: subscripts indicate the number of the sub-sample.

compounds and the antiradical capacity of the bio-wastes was relatively weak ($r > 0.432$, $p < 0.012$ for DPPH* and $r > 0.412$, $p < 0.017$ for ABTS*⁺ free radicals). The relationship between chlorophylls and the capacity to inhibit β -carotene decolouration was moderately strong for chlorophyll *b* ($r = 0.535$, $p = 0.001$) and relatively weak for chlorophyll *a* ($r = 0.322$, $p = 0.055$). However, there was not a statistically significant relationship between chlorophylls and the capacity to prevent TBARS formation or the antiradical capacity of bio-wastes. Therefore, the correlations between antioxidant activity and the phenolic and anthocyanin compounds seem confirm that these compounds played a major role in the antioxidant capacity of mango peel or seed.

To ensure that the quality variables analysed (antioxidant activity and phytochemical compounds) can achieve a separation that explain how the drying treatment affect the quality of the mango peel and seed, multivariate analysis was carried out.

The results of the cluster analysis (CA) made over all studied mango bio-wastes are presented as dendrogram in Fig. 2. Taking as an arbitrary cut-off point a similarity level < 50 , three main clusters can be visualised, one of them consists of mango peel extracted with ethanol:water and the freeze-dried seed, the second cluster contains the mango peel extracted with ethanol and the third one the non-dried and oven-dried seed.

Due to its unsupervised character, CA is not conclusive in and of itself as it merely gives information on the similarity of the different samples. For this reason, principal component analysis (PCA), a technique that illustrates which variables account for most of the variability in the data, was employed. PCA showed two interpretable components, chosen on the basis of Kaiser's criterion (eigenvalues higher than 1.0 are chosen), explaining together 85% of the total variance in dried samples quality (Fig. 3a). Fig. 3b shows the plot of loadings by selecting the two principal components as axes. The first principal component that explains the higher percentage of variance (58%) is mainly related antioxidant activity and to the phenolic and anthocyanin compounds and the second principal component (27% of the variance) is related to the total chlorophyll and chlorophyll *a* content (both with a positive correlation). On the other hand, Fig. 3c also shows the corresponding scores onto the two first principal components. As can be seen, samples are grouped according to their quality in three distinct groups: the mango peel extracted with ethanol:water and the freeze-dried seed, the mango peel extracted with ethanol and the mango seed (non-dried and oven-dried). The variables at the bottom right correspond with mango peel, extracted with ethanol:water, and with freeze-dried seed; the variables at the top left or right of the loading plot correspond with mango peel, extracted with ethanol, that was oven-dried or freeze-dried and non-dried, respectively; and the variables at the bottom left of the plot correspond with the non-dried and oven-dried mango seed. Thus, the plant material with the highest antioxidant capacity (mango peel, extracted with ethanol:water, and freeze-dried seed) was correlated with antioxidant activity (especially with the capacity to scavenge free radicals) and with the phenolic compound content. Therefore, it seems to confirm that the quality of these extracts, in terms of antioxidant activity, is largely related to the polyphenol content of mango peel. Oven-dried peel, extracted with ethanol, scored high for chlorophyll *a* and total chlorophyll, which is in agreement with the results previously obtained.

4. Conclusions

Mango bio-wastes can be stabilised through freeze-drying without reducing its antioxidant activity. This drying method can even increase mango peel's capacity to trap the ABTS*⁺ free radical (when it was extracted with ethanol:water) and also favour mango

seed's capacity to inhibit lipid peroxidation and scavenge free radicals. This behaviour may be due to the fact that a large percentage of phenolic compounds are bound to cellular structures and drying treatments release bound phytochemicals from the matrix to make them more accessible in extraction.

When compared to non-dried material, none of the drying methods evaluated modified the ability of mango peel extracts (obtained from ethanol:water) to inhibit lipid peroxidation and scavenge the DPPH* free radical. However, when the skin was extracted with ethanol, all of the drying treatments evaluated caused the antioxidant activity to decrease, when compared to non-dried material. Oven-drying with forced air also decreased the antioxidant activity of mango seed, compared to non-dried material, in both cases, possibly due to thermal and oxidative degradation of phenolic compounds.

Acknowledgements

E. Dorta and M. Gonzalez would like to thank the Spain's INIA for awarding the PhD grant and the contract within the framework of the "Recursos y Tecnologías Agrarias del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000–2003" strategic action, financed with the involvement of the European Social Fund, respectively. This research was supported through the I+D+I RTA2006-00187 project, financed by the INIA.

References

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., & El-Hamamy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry*, *103*(4), 1134–1140.
- Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G., & Prasada-Rao, U. J. S. (2007a). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, *105*(3), 982–988.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Prasada-Rao, U. J. S. (2007b). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, *102*(4), 1006–1011.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, *73*(2), 239–244.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, *28*(1), 25–30.
- Commission of the European Communities. (2008). *Green paper: on the management of bio-waste in the European Union SEC (2008) 2936*. COM (2008) 811 final. Brussels: Commission of the European Communities.
- Cubas, C., Lobo, M. G., & González, M. (2008). Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by N, N-dimethylformamide using response surface methodology. *Journal Food Composition and Analysis*, *21*(2), 125–133.
- Dorta, E., González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2009). *Reutilization of mango by-products: how extraction solvent and temperature affect their antioxidant properties*. IFT Annual Meeting & Food Expo. Anaheim, CA, USA.
- European Union. (1999). Council directive 1999/31/EC of 26 April 1999 on the landfill of waste. *Official Journal of the European Communities*, L182.
- European Union. (2008). Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. *Official Journal of the European Union*, L312/3.
- González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, *119*(3), 1030–1039.
- Higashi-Okai, K., Kamimoto, K., Yoshioka, A., & Okai, Y. (2002). Potent suppressive activity of fresh and dried peels from Satsuma mandarin *Citrus unshiu* (Marcorv.) on hydroperoxide generation from oxidized linoleic acid. *Phytotherapy Research*, *16*(8), 781–784.
- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T., & Yamasaki, Y. (2009). Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chemistry*, *113*(4), 964–969.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., Borroto, B., & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, *29*(8), 729–733.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1390–1393.

- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of the AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Maisuthisakul, P., & Gordon, M. H. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*, 117(2), 332–341.
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91.
- Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 94–100.
- Piga, A., Del Caro, A., & Corda, G. (2003). From plums to prunes: Influence of drying parameters on polyphenols and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3675–3681.
- Piga, A., Romeo, F. V., Poiana, M., Del Caro, A., Sanguinetti, A. M., Piscopo, A., et al. (2009). Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *European Food Research and Technology*, 228(3), 441–448.
- Ribeiro, S. M. R., Barbosa, I. C. A., Queiroz, J. H., Knödler, M., & Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110(3), 620–626.
- Schieber, A., Berardini, N., & Carle, R. (2003). Identificación de flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5006–5011.
- Siddhuraju, P. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 982–990.
- Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411–417.
- Wojdylo, A., Figiel, A., & Oszmianski, J. (2009). Effect of drying methods with application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1337–1343.
- Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1676–1683.

Reutilization of mango by-products: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties

Dorta, E., Lobo, M. G. & González, M.

Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

Journal of Food Science, 77, C80-C88, 2011

Reutilization of Mango Byproducts: Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties

Eva Dorta, M. Gloria Lobo, and Monica Gonzalez

Abstract: Mango biowastes, obtained after processing, contain large amounts of compounds with antioxidant activity that can be reused to reduce their environmental impact. The present study evaluates the effect of solvent (methanol, ethanol, acetone, water, methanol:water [1:1], ethanol:water [1:1], and acetone:water [1:1]), and temperature (25, 50, and 75 °C) on the efficiency of the extraction of antioxidants from mango peel and seed. Among the factors optimized, extraction solvent was the most important. The solvents that best obtained extracts with high antioxidant capacity were methanol, methanol:water, ethanol:water, and acetone:water (β -carotene test, antioxidant activity coefficient 173 to 926; thiobarbituric acid reactive substances test, inhibition ratio 15% to 89%; 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid ABTS^{•+}; and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH[•] scavenging, 7 to 22 and 8 to 28 g trolox equivalent antioxidant capacity [TE] per 100 g mango biowaste on a dry matter basis [DW]). Similarly, the flavonoid (0.21 to 1.4 g (+)-catechin equivalents per 100 g DW), tannin (3.8 to 14 g tannic acid equivalents per 100 g DW), and proanthocyanidin (0.23 to 7.8 g leucoanthocyanidin equivalents per 100 g DW) content was highest in the peel extracts obtained with methanol, ethanol:water, or acetone:water and in the seed extracts obtained with methanol or acetone:water. From the perspective of food security, it is advisable to choose ethanol (which also has a notable antioxidant content), ethanol:water, or acetone:water, as they are all solvents that can be used in compliance with good manufacturing practice. In general, increasing temperature improves the capacity of the extracts obtained from mango peel and seed to inhibit lipid peroxidation; however, its effect on the extraction of phytochemical compounds or on the capacity of the extracts to scavenge free radicals was negligible in comparison to that of the solvent.

Keywords: antioxidant activity, extraction optimization, free radicals scavenging, *Mangifera indica* L. biowastes, phenolic compounds

Practical Application: There are many antioxidant compounds in mango peel and seed, and they could be used as a natural and very inexpensive alternative to synthetic food additives. However, the conditions in which the antioxidants are extracted must be optimized. This work proves that conditions such as extraction solvent or temperature have a crucial impact on obtaining extracts rich in antioxidants from mango biowastes.

Introduction

The main biowastes produced when processing mangos (*Mangifera indica* L.) are the peel and the seed, which represent approximately 35% to 60% of the fruit (Larrauri and others 1996). The disposal of mango biowaste is a growing problem due to increasing production of this material (estimated to be around 75000 mT worldwide). From an environmental perspective, it is vital to reuse the plant byproducts produced by the agro-food industry.

Mango peel and seed has very high antioxidant activity, a fact attributed to its high phytochemical content (Berardini and others 2005; Soong and Barlow 2006; Abdalla and others 2007; Ajila

and others 2007; Barreto and others 2008). Therefore, mango byproducts have been studied as a safer natural alternative to synthetic food antioxidants in biscuits, buffalo ghee, vegetable oils, and potato chips (Puravankara and others 2000; Abdalla and others 2007).

Most of the developments made over the past few years in the evaluation of antioxidants from mango biowastes have focused on the identification of phytochemical compounds (Berardini and others 2004, 2005; Barreto and others 2008). However, research on sample preparation for analysis, which is the foundation for developing a quality, accurate, robust, and rugged analytical procedure to quantify mango biowaste antioxidants, has not been studied in great detail. The chemical characteristics of the solvent and the diverse structure and composition of the natural products ensure that each biowaste-solvent system behaves differently (González and González 2010; González-Montelongo and others 2010a, 2010b). Moreover, other factors, such as contact time and temperature, number of extraction cycles, solvent to plant material ratio, and extraction technique, significantly influence how

MS 20110788 Submitted 7/1/2011, Accepted 9/25/2011. Authors are with Inst. Canario de Investigaciones Agrarias, Tropical Fruit Crops Dept., Post-harvest and Food Technology Laboratory, P.O. Box 60, 38200 - La Laguna, Spain. Direct inquiries to author Gonzalez (E-mail: glez.glez.monica@gmail.com).

© 2011 Institute of Food Technologists®
doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x
Further reproduction without permission is prohibited

Vol. 00, Nr. 0, 2011 • Journal of Food Science C1

efficiently active ingredients can be recovered from plant biowastes (González and González 2010).

Direct extraction using solvents is the most common technique employed to obtain extracts with high antioxidant activity from mango peel and seeds. Methanol or ethanol has been used as extraction solvents (Barreto and others 2008; Nithitanakool and others 2009); however mixtures of methanol, ethanol, acetone with water (between 50% and 95%) are the most widely used extracting agents for mango biowaste antioxidants (Kabuki and others 2000; Soong and Barlow 2004, 2006; Berardini and others 2005; Abdalla and others 2007; Ajila and others 2007). Extraction is typically conducted at room temperature (Kabuki and others 2000; Puravankara and others 2000; Berardini and others 2005; Barreto and others 2008). But in some cases, hot solvents at temperatures between 70 and 80 °C or heat reflux (Soong and Barlow 2006; Ajila and others 2007; Nithitanakool and others 2009) have been used to extract phytochemical compounds from mango peel and seed.

However, although extraction is a critical step in the analytical determination of antioxidants in mango biowastes, it has not been studied in detail. This work is a 1st attempt at establishing the optimal conditions for obtaining extracts with high antioxidant capacity for mango peel and seed. To this end, how variables such as type of solvent and temperature influence the extraction process of compounds with antioxidant properties from mango biowastes was studied.

Materials and Methods

Plant material

Mango (cv. 'Keitt') was obtained from the research fields of Instituto Canario de Investigaciones Agrarias in Tenerife (Canary Islands, Spain). Fruit (around 20 kg) was harvested at physiological maturity (mature-green stage; maturity indexes for harvesting: 180 to 240 d after full blooming of flowers and change in flesh color from white to yellow) and allowed to ripen, until the consumption stage, at 18 °C and 80% to 90% relative humidity. At full ripeness, lightness (L^*), hue angle (h°), and chromaticity (C^*) of mango peel or pulp were 66 ± 4 or 86 ± 3 , 64 ± 20 or 87 ± 3 , and 49 ± 8 or 78 ± 6 , respectively. Fruit texture was measured as deformation (73 ± 7 Durofel) and penetration force (53 ± 13 N). Total soluble solids, pH, and titratable acidity were 17 ± 3 °Brix, 4.3 ± 0.3 , and 369 ± 77 mg citric acid per 100 g, respectively.

After ripening, the peel or the seed (shell of fibrous endocarp, testa, and embryo) was manually separated by using a very sharp knife, cut (0.5×1 cm), frozen into liquid nitrogen to prevent the antioxidant compounds from oxidation, and freeze dried (Christ alpha-1-4 LSC freeze-dryer, Osterode, Germany) at 50 mPa and -40 °C. The dried mango peels and seeds (water losses, $51 \pm 6\%$ and $71 \pm 2\%$, respectively) were ground to a fine powder by impact grinding with an IKA A11 mill (Staufen im Breisgau, Germany) and sieved for 15 min (sieve Mecánica Científica, 105611, Madrid, Spain). The samples were then granulometrically characterized as follows: peel: 39% > 500 μ m, 12% between 355 and 500 μ m, and 49% < 355 μ m; seed: 48% > 500 μ m, 9% between 355 and 500 μ m, and 43% < 355 μ m. The mango peel and seed were stored at -20 °C until the extractions were carried out.

Solvent extraction

The solvent extraction method to obtain extracts with high antioxidant capacity from mango peel and seed was optimized in this work. Mango peel or seed was extracted with different solvents

(plant material-to-solvent ratio: 1:50 w:v): methanol, ethanol, acetone, water acidified with hydrochloric acid (pH 3.0), or mixtures (1:1 v:v) of the organic solvents and water. High-performance liquid chromatography grade organic solvents were purchased from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain) and deionized water (resistivity: 18 M Ω cm) was obtained with a milli-Q system (Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.). The mixture was homogenized with a Politron PT-6000 (Kinematic AG, Lucerne, Switzerland) high-speed blender at $325 \times g$ for 1 min. The extractions (at least 3 independent processes) were carried out in a water bath at 25, 50, or 75 °C for 60 min in hermetically sealed tubes to avoid solvent loss. Extracts were centrifuged at $3000 \times g$ for 20 min in a Jouan CR-312 centrifuge (Thermo Electron Corp., Madrid, Spain) and stored at -80 °C until the analyses were carried out (in less than 3 d).

Extract capacity to inhibit lipid peroxidation

The antioxidant properties of crude extracts were evaluated by using different methods to obtain information about their capacity to inhibit lipid peroxidation or to scavenge free radicals. All measurements were made on a Shimadzu UV-visible 160A double-beam spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a Hellma (Jamaica, N.Y., U.S.A.) cell (path length: 10^{-2} m). In each method, a control using the different solvents, instead of extracts, was used. The repeatability standard deviation of all the antioxidant activity procedures was <10%.

The β -carotene bleaching method is based on the capacity of antioxidants to decrease oxidative losses of β -carotene (Aldrich, Madrid, Spain) in a β -carotene/linoleic acid (Sigma, Madrid, Spain) emulsion (González-Montelongo and others 2010a). To induce autoxidation, the temperature was increased (50 °C) and oxygenated deionized water (generated by bubbling air into water for 60 min) was used. The loss in orange color intensity, due to the loss of β -carotene conjugated double bonds, was measured at 470 nm after incubation for 210 min. The antioxidant activity was expressed as antioxidant activity coefficient.

The capacity of extracts to react with secondary oxidation products formed in the advanced stages of this reaction was evaluated by using the modified assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) described by González-Montelongo and others (2010a). The method is based on the peroxidation of a liposome system (phosphatidyl-choline, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in chloroform (Scharlau Chimie) induced by iron chloride (Sigma) containing potassium chloride (Merck, Darmstadt, Germany) in the presence of the antioxidants. The production of TBARS was measured at 535 nm after incubation at 95 °C for 60 min and expressed as inhibition ratio (IP%).

Extract capacity to scavenge free radicals

The scavenging activity against the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid ABTS $^{\bullet+}$ radical was determined by a method (Arnao and others 2001) based on enzymatic generation of the radical by reaction of the ABTS (Sigma) with horseradish peroxidase (type VI, RZ [$A_{403\text{ nm}}/A_{275\text{ nm}}] = 2.8$; Sigma) in sodium phosphate buffer pH 7.5, in the presence of hydrogen peroxide (Sigma). The assay temperature was controlled at 25 °C, and the inhibition by the biowaste antioxidants was measured at 730 nm after 6 min.

The capacity to scavenge the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH $^{\bullet}$ (Sigma) radical was monitored according the method described by Brand-Williams and others (1995) at 515 nm after 15 min.

Mango biowastes: antioxidant extraction. . .

In both methods, results were expressed as (González-Montelongo and others 2010a) gram TE (trolox [Aldrich] equivalent antioxidant capacity) per 100 g mango biowaste on a dry matter basis (DW). Calibration graphs ($r^2 > 0.960$), in each of the evaluated solvents, were constructed by plotting the absorbance against the trolox concentration at 7 concentration levels analyzed in triplicate (50 to 500 mg/L).

Phytochemical compound content

The Folin–Ciocalteu method for total phenolic compounds (González-Montelongo and others 2010a) was coupled with the use of polyvinylpyrrolidone (PVPP, Sigma) to measure tannins (FAO/IAEA 2000). The tannins precipitate when PVPP is added to the extracts (PVPP:phenolic compounds ratio: 100:1 w:w) and the pH of the extract is adjusted at 3.0. The supernatant only contains compounds other than tannins; therefore, they were quantified by calculating the difference between total phenolic compounds and the phenols in the supernatant (González and González 2010) and expressed as gram tannic acid (Merck) equivalents (TAEs) per 100 g DW. Calibration curves ($r^2 > 0.990$) were constructed by plotting the absorbance against the tannic acid amount at 7 levels analyzed in triplicate (0.90 to 25 μg). The repeatability of all the procedures used to evaluate phytochemical compounds was $<5\%$.

Total flavonoids were determined by using a spectrophotometric method (Thoo and others 2010), with measurement at 510 nm, based on the formation of complexes between aluminum chloride (BiDH, Barcelona, Spain) and the C-4 keto and the C-3 or C-5 hydroxyl groups of flavones and flavonols and the orthodihydroxyl groups in the A ring or B ring of flavonoids (González and González 2010). Results were expressed as gram catechin (Sigma) equivalents per 100 g DW, and linear calibration curves ($r^2 > 0.997$) were obtained at concentrations between 7.5 and 35 mg.

The determination of condensed tannins (proanthocyanidins) is based on oxidative depolymerization of proanthocyanidins in butanol-HCl (95:5 v:v; Panreac, Madrid, Spain) (solvent:extract ratio, 5:1) (FAO/IAEA 2000). The presence of iron reagent (2% ferric ammonium sulfate [Merck] in 2 N HCl) increases the reproducibility and sensitivity of the assay. The mixture was incubated at 97 °C for 60 min; the proanthocyanidin content (gram leucoanthocyanidin equivalents per 100 g DW) was measured at 550 nm and calculated by the equation

$$\text{Proanthocyanidins} = \left(\frac{Ab_{550} \cdot 78 \cdot \text{dilution factor}}{DW(\%)} \right).$$

Statistical analysis

Data analysis was carried out with the Statgraphics-Plus software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, Md., U.S.A.). Three independent replications by each treatment were used in the statistical analysis. Grubbs' test was applied to detect outliers in the data set and analysis of variance was used to evaluate the effect of the different solvents and temperature extraction on antioxidant activity and phytochemical compound content in mango biowaste extracts. Fisher's least-significant-difference test, at the 5% significance level, was applied to experimental results to assess intrapair significant differences. Simple linear correlation analysis was used to measure the correlation between the phytochemical compounds with the biowaste antioxidant activity.

Results

Effect of temperature and solvent on antioxidant activity in mango peel extracts and on their phytochemical composition

All mango peel extracts prevented the bleaching of β -carotene in carotene/linoleic acid mixtures, although they exhibited varying degrees of antioxidant capacity (Table 1). When extraction was done at 25 °C, the extracts obtained with ethanol:water, acetone, and acetone:water were the most effective in inhibiting the lipid peroxidation (between 1.2 and 1.8 times higher than for the other evaluated solvents). In all mango peel extracts, the capacity to inhibit β -carotene bleaching improved by increasing extraction temperature (Table 1). This increase was dramatic in extracts obtained with simple solvents, specifically methanol and ethanol (around 4 times the activity obtained at 25 °C). In some cases, the temperature increase also improved the antioxidant capacity of the mango peel extracts when this capacity was evaluated with the TBARS method (Table 1). Except for aqueous extracts, whose antioxidant capacity was between 68% and 79% lower than that obtained with the other solvents, at 75 °C, the other mango peel extracts inhibited lipid peroxidation between 66% (ethanol:water) and 80% to 87% (methanol:water, methanol, and acetone:water) more than the control without antioxidants.

The extracts obtained with methanol:water, ethanol:water or acetone:water, and with methanol had the highest capacity to scavenge $\text{ABTS}^{\bullet+}$ and DPPH^{\bullet} radicals (Figure 1). In general, the scavenging activity of mango peel extracts against both free radicals increased slightly when the extraction temperature was increased. When temperature was higher than 25 °C, the antiradical activity increased 1.5 times compared with extractions at 25 °C, especially in extractions with ethanol:water and ethanol (Figure 1). The lowest scavenging activity was observed in aqueous extracts.

Table 1—The effect of extraction solvent and temperature on the capacity of mango peel extracts to inhibit lipid peroxidation.

Extraction temperature	Extraction solvent	β -Carotene bleaching test, AAC	TBARS assay, IP
25 °C	Methanol	201 \pm 28 ^{a/B}	47 \pm 1 ^{a/B}
	Ethanol	155 \pm 3 ^{a/C}	83 \pm 5 ^{a/A}
	Acetone	265 \pm 22 ^{b/B}	61 \pm 1 ^{b/B}
	Water	219 \pm 9 ^{a/B}	27 \pm 5 ^{b/A}
	Methanol:water (1:1)	209 \pm 8 ^{a/B}	24 \pm 2 ^{b/B}
	Ethanol:water (1:1)	286 \pm 14 ^{a/A}	61 \pm 7 ^{b/A}
50 °C	Acetone:water (1:1)	256 \pm 6 ^{b/B}	50 \pm 1 ^{c/C}
	Methanol	822 \pm 104 ^{a/A}	85 \pm 1 ^{a/A}
	Ethanol	548 \pm 13 ^{b/B}	66 \pm 3 ^{b/B}
	Acetone	433 \pm 20 ^{a/A}	86 \pm 3 ^{a/A}
	Water	396 \pm 16 ^{a/A}	18 \pm 1 ^{d/B}
	Methanol:water (1:1)	372 \pm 18 ^{a/A}	84 \pm 2 ^{a/A}
75 °C	Ethanol:water (1:1)	361 \pm 32 ^{a/A}	63 \pm 1 ^{c/A}
	Acetone:water (1:1)	397 \pm 20 ^{a/A}	68 \pm 10 ^{b/B}
	Methanol	791 \pm 26 ^{a/A}	86 \pm 2 ^{a/A}
	Ethanol	670 \pm 88 ^{b/A}	75 \pm 9 ^{b/AB}
	Acetone	495 \pm 25 ^{a/A}	69 \pm 7 ^{a/B}
	Water	440 \pm 90 ^{d/A}	28 \pm 4 ^{a/B}
	Methanol:water (1:1)	375 \pm 18 ^{d/A}	80 \pm 2 ^{b/A}
	Ethanol:water (1:1)	355 \pm 9 ^{d/A}	66 \pm 6 ^{b/A}
	Acetone:water (1:1)	393 \pm 14 ^{d/A}	87 \pm 2 ^{a/A}

Values are the mean \pm standard deviation of at least 3 determinations from independent extractions.

Different lower or upper case letters denote significant differences ($P < 0.050$) between extraction solvents (a to e) or between extraction temperatures (A to C) used to obtain the peel extract, respectively.

AAC = antioxidant activity coefficient; IP = inhibition ratio (%).

Mango biowastes: antioxidant extraction...

Mango peel extracts contained considerable amounts of flavonoids, tannins, and proanthocyanidins (Table 2). Tannins represented 88% to 94% of the total phytochemical compounds found in the extracts, except in those obtained with acetone, in which the tannin content represented 59% to 81% of the total evaluated compounds. Extracts obtained with methanol, ethanol:water, and acetone:water had the highest phenolic compound content (sum of flavonoids, tannins, and proanthocyanidins): 8.1 to 12 g/100 g DW. On the other hand, the lowest phytochemical compound content was observed for aqueous extracts (20% to 79% lower than that obtained with the rest of the solvents). Overall, the impact of extraction temperature on the phytochemical compound content of the extracts was low in comparison to that of the extraction solvent; nevertheless, it is interesting that increasing temperature

favored the extraction of flavonoids with acetone:water, of tannins with acetone or acetone:water, and of proanthocyanidins with ethanol, methanol:water, or acetone:water. On the other hand, when extraction temperature increased, flavonoid and tannin content decreased in methanolic and aqueous extracts, respectively.

Statistical analysis was carried out to determine any correlation between antioxidant capacity and the phytochemical compounds in mango peel extracts (Table 3). The correlations between phytochemical compounds and the inhibition of lipid peroxidation were relatively weak. Therefore, the inhibition of β -carotene bleaching was correlated with proanthocyanidins and the inhibition of TBARS formation with tannins and proanthocyanidins (Table 3). The correlation coefficients indicated a moderately strong relationship between the capacity of biowastes to scavenge $ABTS^{\bullet+}$

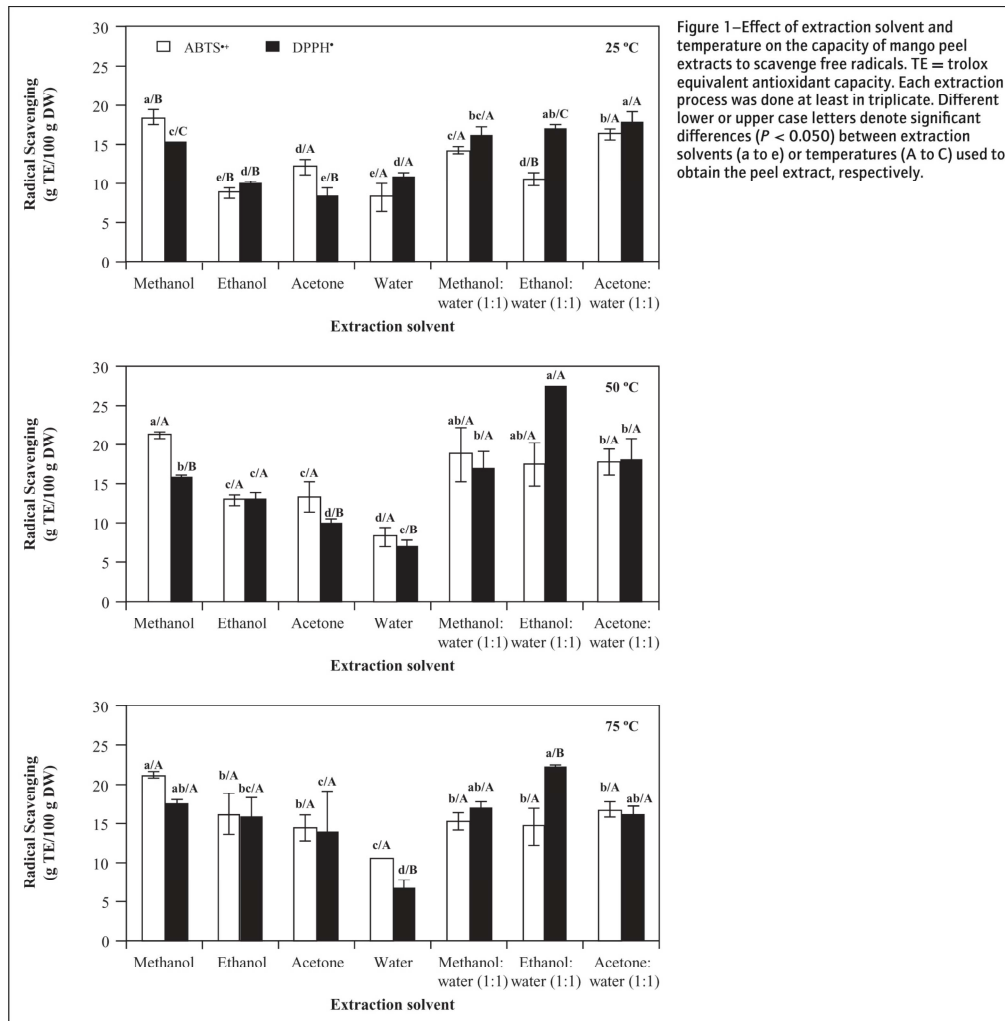


Figure 1—Effect of extraction solvent and temperature on the capacity of mango peel extracts to scavenge free radicals. TE = trolox equivalent antioxidant capacity. Each extraction process was done at least in triplicate. Different lower or upper case letters denote significant differences ($P < 0.050$) between extraction solvents (a to e) or temperatures (A to C) used to obtain the peel extract, respectively.

Mango biowastes: antioxidant extraction...

or DPPH[•] radicals and proanthocyanidin content and of their capacity to scavenge ABTS^{•+} and tannin content. The capacity to scavenge DPPH[•] radicals had relatively weak correlations with flavonoid content and tannin content (Table 3).

Effect of temperature and solvents on antioxidant activity in mango seed extracts and on their phytochemical composition

A high capacity to inhibit lipid peroxidation, evaluated with the β -carotene test, was found in all mango seed extracts (Table 4), although the extracts obtained using methanol and mixtures of methanol, ethanol, and acetone with water were the most efficient in inhibiting lipid peroxidation. Moreover, antioxidant capacity increased (1.6 to 2.4 times) when the extraction temperature was increased. When extraction was done at 25 °C, the extracts obtained with ethanol and acetone were the most effective in inhibiting the lipid peroxidation with the TBARS method (Table 4). However, the temperature increase improved the antiox-

idant capacity of the mango seed extracts obtained with methanol, ethanol:water, and acetone:water while decreasing that of extracts obtained with ethanol and acetone. The aqueous extracts had the lowest (1.5 to 4.0 times) capacity to prevent TBARS formation.

Mango seed extracts showed strong scavenging activity against ABTS^{•+} and DPPH[•] radicals (Figure 2). The extracts obtained with methanol or acetone:water were the most effective in scavenging both free radicals. Moreover, high antioxidant activity for the DPPH[•] assay was also found in extracts obtained with ethanol, methanol:water, or ethanol:water. The impact of extraction temperature on scavenging activity of mango seed extracts was practically negligible in comparison to that of the solvent. The lowest antioxidant activity against ABTS^{•+} and DPPH[•] radicals was found with aqueous extracts.

Most of the mango seed extracts were rich in tannins and proanthocyanidins (Table 5), representing 42% to 93% and 5% to 49%, respectively, of the total phytochemical compounds assayed (flavonoids, tannins, and proanthocyanidins). The highest total phytochemical compound content was found in extracts obtained

Table 2—Phytochemical compounds in mango peel extracts obtained using different solvents and temperatures.

Extraction temperature	Extraction solvent	Total flavonoids ^a	Tannins ^b	Proanthocyanidins ^c
25 °C	Methanol	0.70 ± 0.06 ^{a/A}	9.4 ± 0.7 ^{a/A}	0.58 ± 0.01 ^{a/A}
	Ethanol	0.50 ± 0.05 ^{b/B}	6.0 ± 0.1 ^{d/A}	0.32 ± 0.02 ^{b/B}
	Acetone	0.55 ± 0.05 ^{b/A}	1.1 ± 0.5 ^{f/B}	0.20 ± 0.05 ^{d/A}
	Water	0.18 ± 0.01 ^{e/A}	3.4 ± 0.4 ^{e/A}	0.24 ± 0.03 ^{d/A}
	Methanol:water (1:1)	0.34 ± 0.02 ^{d/A}	4.1 ± 0.5 ^{e/A}	0.23 ± 0.01 ^{d/AB}
50 °C	Ethanol:water (1:1)	0.46 ± 0.09 ^{b/C}	8.1 ± 0.8 ^{b/A}	0.30 ± 0.06 ^{d/A}
	Acetone:water (1:1)	0.43 ± 0.04 ^{d/B}	7.1 ± 0.5 ^{e/B}	0.38 ± 0.03 ^{b/B}
	Methanol	0.38 ± 0.04 ^{e/B}	7.7 ± 1.2 ^{b/A}	0.54 ± 0.02 ^{a/A}
	Ethanol	0.42 ± 0.04 ^{b/C}	6.0 ± 0.4 ^{d/A}	0.31 ± 0.02 ^{b/B}
	Acetone	0.49 ± 0.10 ^{b/A}	2.7 ± 0.6 ^{d/A}	0.25 ± 0.02 ^{d/A}
75 °C	Water	0.17 ± 0.05 ^{d/A}	3.8 ± 0.7 ^{d/A}	0.12 ± 0.02 ^{b/B}
	Methanol:water (1:1)	0.34 ± 0.04 ^{e/A}	6.0 ± 1.2 ^{c/A}	0.18 ± 0.04 ^{b/A}
	Ethanol:water (1:1)	0.38 ± 0.05 ^{b/B}	7.4 ± 1.4 ^{b/A}	0.31 ± 0.01 ^{d/A}
	Acetone:water (1:1)	0.54 ± 0.02 ^{a/A}	10 ± 1 ^{a/A}	0.43 ± 0.02 ^{b/B}
	Methanol	0.37 ± 0.03 ^{b/B}	7.8 ± 0.6 ^{b/A}	0.54 ± 0.02 ^{a/A}
75 °C	Ethanol	0.53 ± 0.04 ^{e/A}	7.5 ± 1.6 ^{b/A}	0.43 ± 0.02 ^{b/A}
	Acetone	0.51 ± 0.05 ^{d/A}	3.3 ± 0.3 ^{d/A}	0.27 ± 0.04 ^{d/A}
	Water	0.17 ± 0.04 ^{e/A}	2.1 ± 0.1 ^{d/B}	0.22 ± 0.04 ^{d/A}
	Methanol:water (1:1)	0.39 ± 0.01 ^{b/A}	5.7 ± 0.7 ^{c/A}	0.32 ± 0.07 ^{d/A}
	Ethanol:water (1:1)	0.25 ± 0.04 ^{c/C}	8.0 ± 1.8 ^{b/A}	0.28 ± 0.05 ^{d/A}
Acetone:water (1:1)	0.56 ± 0.07 ^{a/A}	11 ± 2 ^{a/A}	0.52 ± 0.05 ^{a/A}	

Values are the mean ± standard deviation of at least 3 determinations from independent extractions.

Different lower or upper case letters denote significant differences ($P < 0.050$) between extraction solvents (a-f) or between extraction temperatures (A-C) used to obtain the peel extract, respectively.

^aExpressed as g (+)-catechin equivalents/100 g DW (dry matter basis) plant material.

^bExpressed as g tannic acid equivalents/100 g DW plant material.

^cExpressed as g leucoanthocyanidin equivalents/100 g DW plant material.

Table 3—Correlation (simple regression analysis) between antioxidant activity and phytochemical compounds.

Antioxidant activity/ phytochemical compounds	Total flavonoids		Tannins		Proanthocyanidins	
	P-value ^a	r ^b	P-value ^a	r ^b	P-value ^a	r ^b
Mango peel						
β -Carotene	0.664*	0.056*	0.430*	0.101*	0.002**	0.395*
bleaching test						
TBARS assay	0.095*	-0.212*	0.003**	0.365*	0.002**	0.384*
DPPH [•] test	0.026***	0.268*	0.039***	0.262*	0.000**	0.502*
ABTS ^{•+} test	0.613*	-0.065*	0.000**	0.472*	0.000**	0.611*
Mango seed						
β -Carotene	0.387*	-0.111*	0.012***	0.314*	0.736*	-0.044*
bleaching test						
TBARS assay	0.005**	0.349*	0.005**	0.349*	0.009**	0.325*
DPPH [•] test	0.000**	0.650*	0.000**	0.624*	0.000**	0.539*
ABTS ^{•+} test	0.001**	0.415*	0.000**	0.568*	0.175*	0.175*

^aSignificance level: * $P > 0.050$, ** $P < 0.010$, and *** P between 0.050 and 0.010.

^br = Pearson correlation coefficient; r between 0.250 and 0.450 indicates a relatively weak correlation between the variables, r between 0.450 and 0.900 indicates a moderately strong correlation, r between 0.900 and 1.000 indicates a strong correlation.

Mango biowastes: antioxidant extraction...

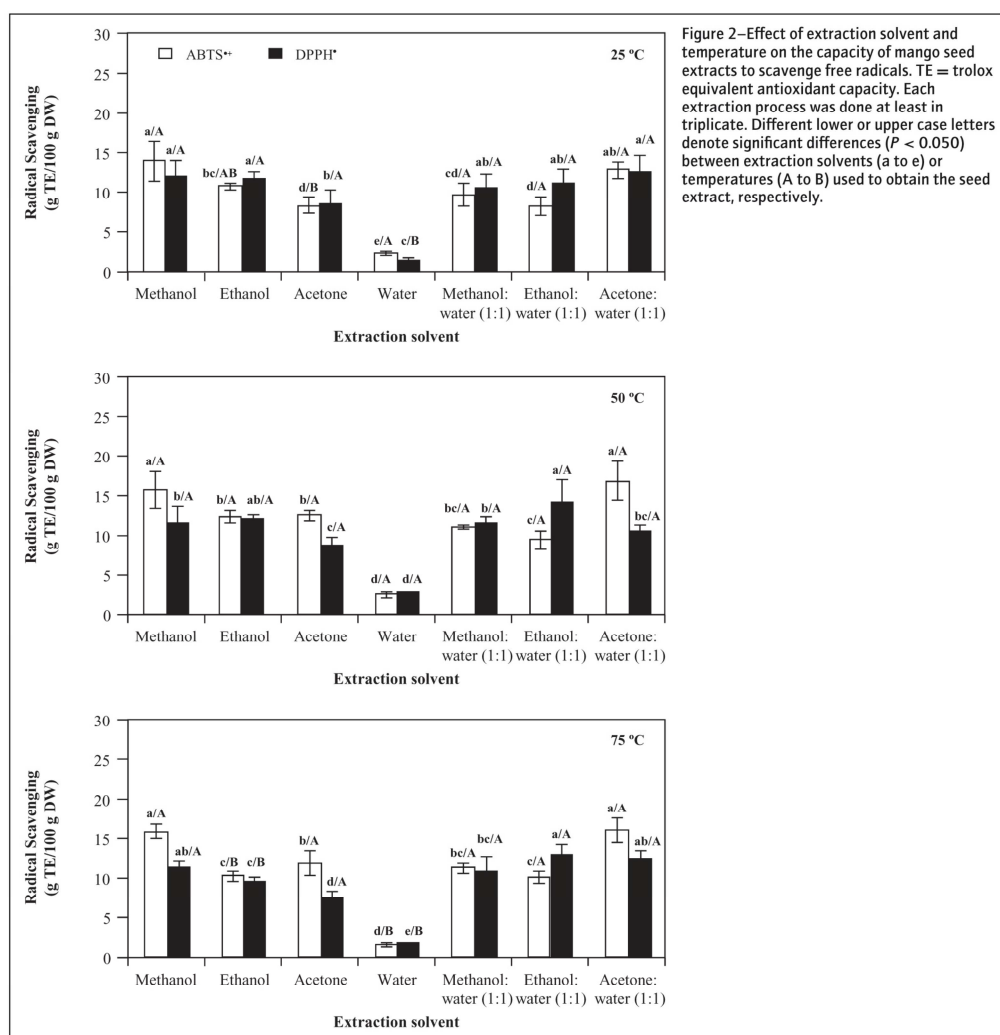
with acetone:water (15 to 21 g/100 g DW) and with methanol (12 to 14 g/100 g) and the lowest in aqueous extracts (around 2.0 g/100 g). Although the effect of temperature extraction was not as important as that of the solvent, it is important to highlight that tannin content increased 50% to 70% in extracts obtained with ethanol, acetone, or ethanol:water when the extraction temperature was increased from 25 to 75 °C (Table 5).

As in the case of mango peel extracts, the correlations between phytochemical compounds and lipid peroxidation inhibition were limited and relatively weak (Table 3). The inhibition of β -carotene bleaching was correlated with tannins and the inhibition of TBARS formation with flavonoids, tannins, and proanthocyanidins. On the other hand, the correlation coefficients indicated a moderately strong relationship between flavonoid, tan-

nin, and proanthocyanidin contents and the capacity of mango seed extracts to scavenge DPPH[•] free radicals and between tannin content and the capacity to scavenge ABTS^{•+} radicals (Table 3). All were positive correlations; therefore, antioxidant activity increased as phytochemical compounds increased.

Discussion

Mango peel and seed contain considerable amounts of phytochemical compounds with remarkable antioxidant activity. However, this work proves that extraction is a critical step in the separation of phytochemical compounds from these biowastes; specifically, extraction solvent and temperature are factors to be taken into account when the aim is to obtain extracts with high antioxidant capacity. The polarity of the solvent and of the different



Mango biowastes: antioxidant extraction. . .

phenolic compounds affect extraction efficiency and the activity of the obtained extracts (González and González 2010) and, in general, highly hydroxylated aglycone forms of phenolic compounds are soluble in alcohols such as methanol or ethanol and their mixtures with water. Less polar solvents such as ethyl acetate, acetone, and chloroform are used for the less polar and highly methoxylated aglycone forms that are common in fruit peel (Lafka and others 2007). Furthermore, with dried materials, low-polarity solvents,

and ethyl acetate simply leach the sample whereas alcoholic solvents rupture cell membranes and enhance the extraction of endocellular materials (Robards 2003). The phytochemicals contained in the extracts obtained by using a polar solvent, for example, water, methanol, ethanol, could be partitioned into a less polar solvent, for example, ethyl acetate, chloroform, diethyl ether, *n*-hexane. *n*-Hexane (Berardini and others 2005) has been also used to remove lipids from plant material prior to extracting antioxidant compounds from them or from the extracts. The most suitable solvents for obtaining mango peel and seed extracts, with high antioxidant capacity were methanol, methanol:water, ethanol:water, and acetone:water. Similarly, the phytochemical compound content (flavonoids, tannins, and proanthocyanidins) was highest in peel extracts obtained with methanol, ethanol:water, or acetone:water and in seed extracts obtained with methanol or acetone:water. The most widely reported extracting solvents for mango biowaste antioxidants are mixtures (between 50% and 95%) of methanol, ethanol, and acetone with water (Kabuki and others 2000; Soong and Barlow 2004, 2006; Berardini and others 2005; Abdalla and others 2007; Ajila and others 2007). Among these, the acetone:water mixture has been reported as one of or the most effective solvent for extracting phenolic compounds from fruit by-products (Shui and Leong 2006; González-Montelongo and others 2010b), specifically in the extraction of polyphenols from protein matrices, since they appear to degrade polyphenol-protein complexes (Kallithraka and others 1995). This could explain why it is so efficient when extracting antioxidants from mango seed, as this material has a high protein content (6.7 g/100 g DW) (Abdalla and others 2007).

The low antioxidant capacity and content of phytochemical compounds detected in aqueous extracts obtained from peel and seed extracts could be related to the unipolar character of the cell walls of the plant material; this characteristic allows solvents that are less polar than water (methanol, ethanol and acetone) to extract the antioxidant compounds from cells more easily. Similar results

Table 4—The effect of extraction solvent and temperature on the capacity of mango seed extracts to inhibit lipid peroxidation.

Extraction temperature	Extraction solvent	β -Carotene bleaching test, AAC	TBARS assay, IP
25 °C	Methanol	218 ± 19 ^{a/B}	44 ± 10 ^{b/B}
	Ethanol	192 ± 1 ^{b/C}	87 ± 1 ^{a/A}
	Acetone	133 ± 10 ^{d/C}	85 ± 4 ^{a/A}
	Water	161 ± 19 ^{c/C}	27 ± 2 ^{d/A}
	Methanol:water (1:1)	237 ± 3 ^{a/C}	18 ± 3 ^{d/C}
50 °C	Ethanol:water (1:1)	223 ± 18 ^{a/B}	48 ± 7 ^{b/B}
	Acetone:water (1:1)	229 ± 9 ^{b/B}	73 ± 4 ^{b/B}
	Methanol	444 ± 50 ^{a/A}	78 ± 9 ^{a/B}
	Ethanol	293 ± 12 ^{b/B}	60 ± 3 ^{b/B}
	Acetone	321 ± 32 ^{c/A}	67 ± 2 ^{b/B}
75 °C	Water	472 ± 19 ^{a/A}	23 ± 4 ^{d/A}
	Methanol:water (1:1)	457 ± 31 ^{a/A}	53 ± 3 ^{b/B}
	Ethanol:water (1:1)	459 ± 4 ^{a/A}	80 ± 4 ^{a/A}
	Acetone:water (1:1)	394 ± 48 ^{b/A}	85 ± 1 ^{a/A}
	Methanol	523 ± 45 ^{a/A}	68 ± 3 ^{a/A}
75 °C	Ethanol	361 ± 6 ^{c/A}	52 ± 1 ^{c/C}
	Acetone	265 ± 3 ^{d/B}	58 ± 1 ^{d/C}
	Water	331 ± 46 ^{c/B}	20 ± 3 ^{f/A}
	Methanol:water (1:1)	368 ± 4 ^{b/B}	66 ± 1 ^{e/A}
	Ethanol:water (1:1)	467 ± 6 ^{b/A}	82 ± 4 ^{a/A}
Acetone:water (1:1)	439 ± 14 ^{b/A}	72 ± 5 ^{b/B}	

Values are the mean ± standard deviation of at least 3 determinations from independent extractions. Different lower or upper case letters denote significant differences ($P < 0.050$) between extraction solvents (a to f) or between extraction temperatures (A to C) used to obtain the seed extract, respectively. AAC = antioxidant activity coefficient; IP = inhibition ratio (%).

Table 5—Phytochemical compounds in mango seed extracts obtained using different solvents and temperatures.

Extraction temperature	Extraction solvent	Total flavonoids ^a	Tannins ^b	Proanthocyanidins ^c
25 °C	Methanol	0.93 ± 0.06 ^{b/A}	11 ± 2 ^{b/A}	2.3 ± 0.1 ^{c/A}
	Ethanol	0.63 ± 0.13 ^{d/B}	3.5 ± 0.4 ^{d/B}	1.6 ± 0.4 ^{d/A}
	Acetone	0.54 ± 0.12 ^{e/B}	2.1 ± 0.8 ^{e/B}	1.4 ± 0.1 ^{d/A}
	Water	0.075 ± 0.009 ^{e/A}	1.5 ± 0.1 ^{f/A}	0.091 ± 0.001 ^{e/B}
	Methanol:water (1:1)	0.70 ± 0.05 ^{c/A}	6.8 ± 0.4 ^{c/A}	1.8 ± 0.1 ^{cd/A}
50 °C	Ethanol:water (1:1)	0.95 ± 0.01 ^{b/A}	4.3 ± 0.5 ^{d/B}	5.1 ± 0.4 ^{b/A}
	Acetone:water (1:1)	1.3 ± 0.1 ^{a/A}	13 ± 1 ^{a/A}	7.0 ± 0.8 ^{a/A}
	Methanol	0.48 ± 0.04 ^{c/C}	9.9 ± 0.4 ^{d/A}	1.5 ± 0.1 ^{b/C}
	Ethanol	0.50 ± 0.08 ^{b/B}	5.2 ± 0.9 ^{b/B}	1.8 ± 0.3 ^{b/A}
	Acetone	0.38 ± 0.06 ^{c/C}	3.9 ± 1.0 ^{e/B}	0.95 ± 0.01 ^{e/B}
75 °C	Water	0.079 ± 0.02 ^{d/A}	1.7 ± 0.3 ^{d/A}	0.047 ± 0.005 ^{e/B}
	Methanol:water (1:1)	0.47 ± 0.02 ^{b/B}	6.5 ± 0.5 ^{b/A}	1.4 ± 0.2 ^{b/A}
	Ethanol:water (1:1)	0.42 ± 0.10 ^{b/C}	6.1 ± 0.7 ^{b/B}	1.9 ± 0.3 ^{b/C}
	Acetone:water (1:1)	0.93 ± 0.04 ^{b/B}	11 ± 1 ^{a/B}	3.8 ± 0.6 ^{b/B}
	Methanol	0.72 ± 0.04 ^{b/B}	11 ± 1 ^{a/A}	1.7 ± 0.2 ^{b/B}
75 °C	Ethanol	0.85 ± 0.11 ^{b/A}	9.6 ± 1.2 ^{ab/A}	1.7 ± 0.1 ^{c/A}
	Acetone	0.75 ± 0.01 ^{b/C}	6.9 ± 1.2 ^{c/A}	1.4 ± 0.1 ^{c/A}
	Water	0.057 ± 0.007 ^{d/A}	1.4 ± 0.1 ^{d/A}	0.28 ± 0.04 ^{d/A}
	Methanol:water (1:1)	0.71 ± 0.13 ^{c/A}	6.9 ± 0.6 ^{c/A}	1.6 ± 0.3 ^{c/A}
	Ethanol:water (1:1)	0.97 ± 0.02 ^{c/C}	8.3 ± 1.8 ^{bc/A}	2.7 ± 0.3 ^{b/AB}
Acetone:water (1:1)	0.66 ± 0.05 ^{c/C}	10 ± 1 ^{a/B}	4.4 ± 0.7 ^{b/B}	

Values are the mean ± standard deviation of at least 3 determinations from independent extractions. Different lower or upper case letters denote significant differences ($P < 0.050$) between extraction solvents (a to f) or between extraction temperatures (A to C) used to obtain the seed extract, respectively.

^aExpressed as g (+)-catechin equivalents/100 g DW plant material.
^bExpressed as g tannic acid equivalents/100 g DW (dry matter basis) plant material.
^cExpressed as g leucoanthocyanidin equivalents/100 g DW plant material.

Mango biowastes: antioxidant extraction...

have been described for grape by-products (Lapornik and others 2005) and murta leaves (Rubilar and others 2006), where water was not an adequate medium for extraction, while mixtures with alcohols were more efficient solvents. Another explanation for the decrease could be ascribed to the polyphenol oxidase enzyme, which degrades polyphenols in aqueous extracts (brown hue observed in these extracts), whereas in other solvents the enzyme is inactive (González-Montelongo and others 2010b).

The use of organic solvents in the manufacturing process of food ingredients is strictly regulated in the European Union (2009). Although mango peel and seed extracts obtained with methanol (not a food-grade solvent) have high antioxidant activity, the conditions under which methanol can be used are strict and maximum residue values permitted in food and food ingredients are limited. Therefore, from the perspective of food security, it would be preferable to choose solvents such as ethanol (also with notable antioxidant activity and phytochemical compound content), ethanol:water or acetone:water, as they can all be used in compliance with good manufacturing practice. Similar decisions have been taken by Lapornik and others (2005), although they described that methanol had better characteristics than ethanol to extract polyphenols from red and black currant marc and from grape marc, in the end ethanol was selected because it was better suited for use in the food industry.

The results obtained in this work show that, in general, temperature favors the capacity of mango peel and seed extracts to inhibit lipid peroxidation; however, the effect on the extraction of phytochemical compounds or on the capacity of the extracts to scavenge free radicals was practically negligible in comparison to that of the solvent. High temperatures have been reported to improve the efficiency of extraction, due to the enhanced diffusion rate and solubility of phytochemicals in solvents. However, elevated temperatures could also affect the activity of the extracts due to the degradation of the phytochemical compounds (Yap and others 2009; Dorta and others 2012), losses due to volatilization, or antioxidant compounds reacting with other components of the plant material, thus impeding extraction (González and González 2010). This behavior was similar to the findings of González-Montelongo and others (2010a) in the extraction of banana peel with methanol, temperature had a high impact on the extract's capacity to prevent lipid peroxidation. However, the effect of changing extraction temperature was not statistically significant for scavenging ABTS^{•+} or DPPH[•] radicals or extracting phenolic compounds. This could indicate that it is more difficult to extract the phytochemical compounds that inhibit lipid peroxidation at low temperatures (possibly because of their lower solubility in the solvents) than phytochemical compounds that scavenge radicals. The optimization of the antioxidant extraction from murta leaves (Rubilar and others 2006) and from apple pomace (Wijngaard and Brunton 2010) showed that increasing temperature improved extraction; however, temperature could not be increased indefinitely, because the stability of phenolic compounds decreased. It has also been reported that raising the extraction temperature from 40 to 100 °C does not yield a higher content of phenolic compounds and stronger antioxidant capacity in extracts obtained from citrus peel (Xu and others 2008).

In relation to the antioxidant activity and phenolic compound content described for mango biowaste extracts in this work, data were similar than what was reported for mango peel by Ajila and others (2007) (extraction with ethanol:water or acetone:water [4:1, v:v] at room temperature; 5.5 to 11 g GAEs per 100 g DW) and for mango seed by Maisuthisakul and Gordon (2009)

(extraction with 95% ethanol, refluxing for 3 h; 20-g ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AE) per 100 g DW; and 6.8 g TAEs/100 g DW) or Soong and Barlow (2004, 2006) (extraction with ethanol:water [1:1, v:v], at 70 °C for 1 h; 14 to 35 g AE/100 g DW; and 12 g GAEs/100 g DW). However, important discrepancies were found between the phytochemical content reported by Berardini and others (2005) from mango peel (extraction with acetone:water [4:1, v:v], at room temperature for 3 h; flavonol-*O*-glycosides; and xanthone-*C*-glycosides 0.020 to 0.50 g/100 g DW) or by Abdalla and others (2007) from mango seed (extraction with methanol:water [19:1, v:v], at 4 °C for 4 min; 0.11 g GAEs/100 g DW; and 0.023 g TAEs/100 g DW) and the content obtained in this work. The similarities and discrepancies could be related, among other factors, to similar or dissimilar extraction conditions used to obtain these compounds from the plant matrices. However, it is necessary to be careful when comparing data described by different authors, because the phytochemical composition of mango biowastes can vary depending on cultivar or other preharvest factors such as climate (temperatures, rainfalls, and light hours), soil type, and fertilization (González and González 2010).

Conclusions

The results of this work confirm that optimizing extraction conditions is a critical step in obtaining extracts rich in antioxidants from mango byproducts. The most important factor among the optimized conditions is the extraction solvent. The most suitable solvents to obtain extracts with high antioxidant capacity and high phytochemical compound content from mango peel are ethanol and ethanol:water (1:1); from mango seed the most suitable is acetone:water (1:1). Extraction temperature also contributes to extraction efficiency; specifically, temperatures between 50 and 75 °C favor the capacity of the extracts obtained from mango peel and seed to inhibit lipid peroxidation.

Acknowledgments

E. Dorta would like to thank the Spanish "Inst. Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria" (INIA) for awarding the PhD INIA grant. This research was supported through the RTA2006-00187 project, also financed by the INIA.

References

- Abdalla AEM, Darwish S, Ayad EHE, El-Hamamah RM. 2007. Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chem* 103:1134-40.
- Ajila CM, Naidu KA, Bhat SG, Prasada-Rao UJS. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chem* 105:982-8.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73:239-44.
- Barreto JC, Trevisan MTS, Hull WE, Erben G, de Brito ES, Pfundstein B, Würtele G, Spiegelhalter B, Owen RW. 2008. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *J Agric Food Chem* 56:5599-610.
- Berardini N, Carle R, Schieber A. 2004. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:2208-16.
- Berardini N, Fezer R, Conrad J, Belfus U, Carle R, Schieber A. 2005. Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol *O*- and xanthone *C*-glycosides, anthocyanins, and pectin. *J Agric Food Chem* 53:1563-70.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28:25-30.
- Dorta E, Lobo MG, González M. 2012. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 45:261-8.
- European Union. 2009. Directive 2009/32/CE of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the member states on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. *Off J Eur Commun* L141:3-11.
- FAO/IAEA. 2000. Quantification of tannins in tree foliage. Vienna, Austria: Joint FAO/IAEA Div. of Nuclear Techniques in food and Agriculture. 26 p.
- González M, González V. 2010. Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Anal Methods* 2:1842-66.

Mango biowastes: antioxidant extraction . .

- González-Montelongo R, Lobo MG, González M. 2010a. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Sep Purif Technol* 71:347–55.
- González-Montelongo R, Lobo MG, González M. 2010b. Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem* 119:1030–9.
- Kabuki T, Nakajima H, Arai M, Ueda S, Kuwabara Y, Dosako S. 2000. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chem* 71:61–6.
- Kallithraka S, García-Viguera C, Bridle P, Bakker J. 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem Anal* 6:265–7.
- Laika TI, Sinanoglou V, Lazos ES. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem* 104(3):1206–14.
- Lapornik B, Prosek M, Wondra AG. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* 1:214–22.
- Larrauri JA, Rupérez P, Borroto B, Saura-Calixto F. 1996. Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *LWT-Food Sci Technol* 29:729–33.
- Maisuthisakul P, Gordon MH. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chem* 117:332–41.
- Nithitanakool S, Pithayanukul P, Bavovada R, Sarpapakorn P. 2009. Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules* 14:257–65.
- Puravankara D, Boghra V, Sharma RS. 2000. Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *J Sci Food Agric* 80:522–6.
- Robards K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A* 1000:657–91.
- Rubilar M, Pinelo M, Ihl M, Scheuermann E, Sineiro J, Nuñez MJ. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *J Agric Food Chem* 54: 59–64.
- Shui G, Leong LP. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chem* 97:277–84.
- Soong YY, Barlow PJ. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 88(3):411–7.
- Soong YY, Barlow PJ. 2006. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dioscarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem* 97:524–30.
- Thoo YY, Ho SK, Liang JY, Ho CW, Tan CP. 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem* 120:290–5.
- Wijngaard HH, Brunton N. 2010. The optimisation of solid-liquid extraction of antioxidant from apple pomace by response surface methodology. *J Food Eng* 96:134–40.
- Xu GH, Chen JC, Liu DH, Zhang YH, Jiang P, Ye XQ. 2008. Minerals, phenolics compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *J Food Sci* 73: C11–8.
- Yap CF, Ho CW, Wan Aida WM, Chan SW, Lee CY, Leong YS. 2009. Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana* 38(4):511–20.

**Optimization of factors affecting extraction of antioxidants
from mango seed**

Dorta, E., Lobo, M. G. & González, M.

*Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of
Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias,
Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain*

Food and Bioprocess Technology, 6, 1067-1081, 2013

Food Bioprocess Technol (2013) 6:1067–1081
DOI 10.1007/s11947-011-0750-0

ORIGINAL PAPER

Optimization of Factors Affecting Extraction of Antioxidants from Mango Seed

Eva Dorta · M. Gloria Lobo · Mónica González

Received: 31 August 2011 / Accepted: 23 November 2011 / Published online: 8 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract A microwave-assisted extraction procedure was developed to obtain extracts rich in antioxidants from mango seed. Central composite design ‘2³+star’ and response surface methodology were used in order to optimise the extraction factors: the water content in the acetone/water mixture used as extractant, seed weight-to-solvent volume ratio, number of steps, extraction time and pH of water. The results suggest that the extractant composition and the seed weight-to-solvent volume ratio were statistically the most significant factors. The optimum values of the factors that influence the capacity to inhibit lipid peroxidation (evaluated with the β -carotene bleaching test), scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid-free radicals and obtain extracts with high phenolic compound content (tannins and proanthocyanidins) were three steps; the mixture acetone/water (50:50, v/v) as extractant, a seed weight-to-solvent volume ratio of 1:30 (w/v), an extraction time of 0 min in the microwave (the rest of the extraction process includes homogenisation and centrifugation time), and a pH of 8.0.

Keywords *Mangifera indica* L. biowastes · Microwave-assisted extraction · Response surface methodology · Lipid peroxidation inhibition · Free radicals scavenging · Phenolic compounds

Meeting presentation This work was presented and published, in the form of abstract, in the 2010 EFFOST Annual Meeting: Food and Health; 10–12 November 2010; Dublin, Ireland.

E. Dorta · M. G. Lobo · M. González (✉)
Post-harvest and Food Technology Laboratory,
Department of Tropical Fruit Crops,
Instituto Canario de Investigaciones Agrarias,
Apdo. 60,
38200 La Laguna, Spain
e-mail: glez.glez.monica@gmail.com

Introduction

The growing concern about food safety on the part of consumers, authorities and food industry producers (Commission of the European Communities 2000) has created a need to identify safer natural alternatives to synthetic additives. The food industry has already begun studying fruit biowastes as one of such alternative because plant biowastes contain many compounds that have antioxidant and antimicrobial capacity. The main biowastes of mango (*Mangifera indica* L.) processing are the peel and the seed, which represent approximately 35–60% of the fruit (Larrauri et al. 1996). Mango seed has been shown to be a good source of polyphenols, sesquiterpenoids, phytosterols and tocopherols, with high antioxidant activity (Kabuki et al. 2000; Puravankara et al. 2000; Berardini et al. 2004; Soong and Barlow 2004, 2006; Abdalla et al. 2007; Engels et al. 2009, 2010; Maisuthisakul and Gordon 2009).

Extraction is the most important step in recovering phytochemical antioxidants from plant biowastes, since its objective is to liberate these compounds from the structures where they are found (González and González 2010; González-Montelongo et al. 2010a; Dorta et al. 2011). Solvent extraction is the most common technique employed to obtain extracts with high antioxidant activity from mango seeds. Methanol or ethanol have been used as extraction solvents (Barreto et al. 2008; Nithitanakool et al. 2009); however, mixtures of ethanol or acetone with water (between 50% and 99.5%) are the most widely used extracting agents for antioxidants from mango seed (Kabuki et al. 2000; Berardini et al. 2004; Soong and Barlow 2004, 2006; Abdalla et al. 2007; Ribeiro et al. 2008; Engels et al. 2009, 2010; Maisuthisakul and Gordon 2009; Dorta et al. 2011). The recovery of bioactive compounds from biowastes is also influenced by the extraction time and the number of steps. Extraction times of a few minutes (less than 5 min; Abdalla et al. 2007) or hours (between 1 and

12 h; Kabuki et al. 2000; Berardini et al. 2004; Barreto et al. 2008; Ribeiro et al. 2008; Soong and Barlow 2004, 2006; Engels et al. 2009; 2010; Maisuthisakul and Gordon 2009; Dorta et al. 2011) have been used. Usually, a single extraction step is used (Kabuki et al. 2000; Soong and Barlow 2004, 2006; Abdalla et al. 2007; Dorta et al. 2011) but sometimes from two to three steps have been used (Berardini et al. 2004; Barreto et al. 2008; Ribeiro et al. 2008; Engels et al. 2009, 2010). Another aspect to take into consideration when extracting antioxidant compounds from biowastes is the plant material weight to solvent volume ratio. The most commonly reported ratios range between 1:1 and 1:10 (*w/v*; Kabuki et al. 2000; Abdalla et al. 2007; Engels et al. 2009; 2010; Maisuthisakul and Gordon 2009; Nithitanakool et al. 2009). However, higher ratios between 1:20 and 1:100 (*w/v*; Berardini et al. 2004; Ribeiro et al. 2008; Dorta et al. 2011) or between 1:125 and 1:250 (*w/v*; Soong and Barlow 2004, 2006) have also been used with promising results.

However, the procedures employed to extract phytochemicals from mango seed have only been optimised for the extraction of other types of plant material, not specifically for mango seed. Extraction procedures differ between different biowastes because of their different matrices, with unique properties in terms of structure and composition (related to species, varieties, ripening stages, etc.). Therefore, considerable caution should be exercised when using procedures that have been developed for specific plant tissue types and phytochemical extractions should be optimised for each biowaste (González and González 2010; González-Montelongo et al. 2010a). Recently, our research group recently studied how factors such as the type of solvent and temperature influence the extraction process of compounds with antioxidant properties from mango peel and seed (Dorta et al. 2011).

Microwave energy has been used to accelerate solvent extraction of antioxidant phytochemicals from plant material (Pan et al. 2008; Périno-Issartier et al. 2011; Routray and Orsat 2011). Microwave-assisted extraction (MAE) provides higher recoveries and requires considerably less time and smaller amounts of solvents compared to conventional extraction with solvents (González and González 2010). For example, the phenolic compounds from longan pericarp were extracted with 95% ethanol (plant material weight to solvent volume ratio 1:10, *w/v*) employing MAE, at 80 °C for 30 min (Pan et al. 2008). The phenolic content of extracts obtained from longan pericarp was similar when using either MAE or Soxhlet extraction. However, the antioxidant activity of microwave-assisted extracts was superior to that of Soxhlet extracts, had faster extraction times (2 h for Soxhlet and 30 min for MAE) and required less solvent. All of which are clear advantages to using this technique. Despite its advantages, it has rarely been used to extract phytochemicals from tropical biowastes and no information

about the application of MAE for extracting bioactive compounds or for obtaining extracts with high antioxidant activity of mango seed was found.

Response surface methodology (RSM) is a useful technique to evaluate the effect of influential factors on one or more response variables, which are simultaneously modified. Moreover, the establishment of a mathematical model helps to locate the region where the extraction is optimised (Montgomery 1991). The choice of an experimental design mainly depends on the objectives of the experiment. Therefore, randomised block designs are used if the primary goal of the experiment is to verify if a factor considered to be important continues to be so in the presence of the other factors. Full or fractional factorial designs are used if the primary purpose of the experiment is to identify the few influential factors among all of the factors evaluated. However, if the experimental design is used to find improved or optimal process settings, central composite (CCD) or Box–Behnken designs are usually used.

CCD and RSM have been used to optimise the extraction of phytochemical compounds from tropical fruit biowastes. The optimisation of the number of steps (optimum obtained with 3), extraction time (homogenisation for 1 min and further centrifugation for 20 min) and temperature (25 °C) when extracting phenolics from banana peel (González-Montelongo et al. 2010a) has been carried out by experimental design. The effect of acetone concentration in water, extraction temperature and extraction time on phenolic content extracted from star fruit residue was also studied by using RSM (Yap et al. 2009). Acetone concentration was statistically the most significant factor and the optimal extraction conditions obtained were: 65% acetone concentration, 43 °C extraction temperature and 3.9 h extraction time. However, although CCD and RSM have been used for the optimisation of the microwave-assisted extraction of phytochemicals from plant materials, there are no applications in tropical fruit bio-wastes.

Optimising conditions to obtain extracts with high antioxidant activity from mango seed using microwave-assisted extraction is proposed for the first time in this study. The use of a CCD and RSM to optimise five factors (water content in the solvent mixture, seed weight-to-solvent volume ratio, number of steps, extraction time and water pH in the extractant) determines an optimal set of operational conditions.

Materials and Methods

Chemical and Reagents

Gallic acid, Folin–Ciocalteu reagent (2 N), linoleic acid, Tween 40, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS),

hydrogen peroxide (30%) and polyvinylpyrrolidone were purchased from Sigma (Madrid, Spain). (\pm) 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) and trans- β -carotene were supplied by Aldrich (Madrid, Spain). The concentration of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) type VI [RZ ($A_{403\text{ nm}}/A_{275\text{ nm}}$)=2.8], obtained from Sigma, was determined by measuring the absorbance at 403 nm using an extinction coefficient of $\epsilon_{403\text{ nm}}=100\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Arnao et al. 2001). Tannic acid and ferric ammonium sulphate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and hydrochloric acid and *n*-butanol from Panreac (Madrid, Spain). Acetone and chloroform were purchased of high-performance liquid chromatography grade from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Deionised water of 18 M Ω cm resistivity purified with a milli-Q system (Millipore, Bedford, USA) was used.

Obtaining Mango Seeds

Mango (*M. indica* L., cv. 'Keitt') was obtained from fields located in Tenerife (Canary Islands, Spain). Fruit (around 20 kg) was harvested at physiological maturity stage (mature—green) and allowed to ripen (full-ripeness or consumption stage) at 18 °C and 80–90% relative humidity. The ripeness stage of the mangoes ($n=21$) was characterised by peel and pulp colour and texture, total soluble solids, pH and titratable acidity.

Peel and pulp colour were measured (CIELab colour space) in three different points of the fruit equator with a Minolta Chroma Meter model CR-300 (Ramsay, USA) colour difference metre, using chromatic attributes: lightness (L^*), hue angle (h°) and chroma value (C^*). The measuring area of the colourimeter has a diameter of 8 mm; the illuminant and the standard observer used for testing were D65 and 2°, respectively; a white calibration plate was used to calibrate the colourimeter. L^* , h° and C^* of mango peel at full ripeness ranged between 62 and 70, 44 and 84, and 41 and 57, respectively. The colour of mango pulp was also characterised by lightness ranging between 83 and 89, hue angle between 84 and 90 and chromaticity between 72 and 84.

Deformation force was measured using a Durofel DFT 100 (Agro Technologie, Forges Les Eaux, France) with a mobile tip of 25 mm², that gives a unit (° Durofel) for each 0.025 mm of fruit deformation. Penetration force was measured with a TA-HD-Plus texture analyzer supplied by Texture Technologies Co. (Godalming, UK). Mangoes were placed horizontally on the plate and compression was applied using a cylindrical probe (4.0 mm in diameter) at an assay speed of 2.0 mm/s. The range of deformation and penetration force was 66–80°Durofel and 40–66 N, respectively.

Total soluble solids (TSS) were determined using an ATAGO ATC-1 hand refractometer (Tokyo, Japan) and pH was measured by a WTW pH metre (St Woburn, USA) at

room temperature. After determination of pH, titratable acidity was measured with 0.1 N sodium hydroxide standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) up to pH 8.1. TSS, pH and titratable acidity ranged between: 14–20 °Brix, 4.0–4.6 and 292–446 mg citric acid/100 g, respectively.

After ripening, the seed (shell of fibrous endocarp, testa and embryo) was manually separated (seed weight ranged between 2.1% and 6.3% of total mango weight), cut into small pieces (0.5×1 cm) and freeze-dried using a Christ alpha-1-4 LSC freeze-dryer (Osterode, Germany). The condenser temperature was -40 °C, the shelf temperature was set at 25 °C and the vacuum was 50 mPa for 5 days (Dorta et al. 2012). The dried mango seeds (water content, 49±5%; lightness, 76±1; hue angle, 91±1; chromaticity, 14±1) were ground to a fine powder by impact grinding with an IKA A11 mill (Staufen im Breisgau, Germany) and sieved by intense vibratory and rotary movements for 15 min (Mecánica Científica, 105611 sieve, Madrid, Spain), using nine sieves with diameters ranging between 2.8 mm and 50 μm . Thus, the sample granulometry was characterised: 48%>500 μm , 9% between 355 and 500 μm and 43%<355 μm . The dried mango seed powder was stored at 20 °C until the extractions were carried out.

Microwave-Assisted Extraction

All extractions were carried out using microwave (ETHOS 1, Milestone SRL, Sorisole, Italy) at 50 °C and an initial potency of 500 W (Dorta et al. 2011). The temperature in the microwave extractor was continually controlled allowing the accurate and precise temperature control in all extraction vessels. The control system included a direct temperature control device (a sapphire fibre optic sensing element (ATC-FO sensor, MLS GmbH, Leutkirch, Germany) inserted in one of the extraction vessels) and a focused, high sensitivity infrared sensor, both interfaced to a microprocessor-controlled rotor positioning system. The extraction was carried out in closed vessels, with a built-in safety valve. An accurately weighed aliquot of freeze-dried seed powder (seed weight-to-solvent volume ratio varied depending on the particular experiment; ranging between 1:10–1:50 w/v) was homogenised, with a Politron PT-6000 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) high speed blender at 1,250 rad/s for 1 min, with 20 ml of acetone:water (water content varied depending on the particular experiment; ranging between 5% and 95%). Water pH and extraction time (ranging between 3–8 and 0–120 min, respectively) were also modified depending on the particular experiment. Extracts were centrifuged at 525 rad/s for 20 min in a Jouan CR-312 centrifuge (Thermo Electron Corporation, Madrid, Spain). Therefore, the extraction time includes the time of the high-speed homogenisation (1 min), the time in the microwave (0–120 min) and the centrifugation time (20 min).

Depending on the experiment, this procedure was repeated between one and three times; the resulting supernatants were mixed together and acetone/water was added until a final volume of 60 ml was reached. The extracts obtained were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the assessments of antioxidant potential and bioactive compound content were carried out (in less than 3 days). Each extraction process was done in triplicate.

Experimental Design

A CCD '2⁵+star' projected on a face-centred star design with two centre points was used to identify the relationship between five independent factors and the dependent variables or responses, as well as to determine the optimal conditions for the extraction process. The factors (water content in the solvent mixture, seed weight-to-solvent volume ratio, number of steps, extraction time and water pH) were set at three separate coded levels (Table 1). The design consisted of 44 randomised runs ($n=132$ experiments, because each extraction process was done in triplicate), with 32 factorial points, two centre points and 10 axial points. The antioxidant activity (evaluated using the β -carotene, DPPH[•] and ABTS^{•+} tests) and the phenolic compound (tannins and proanthocyanidins) content were chosen as the dependent variables because of their known dependency on the extraction process. Data from the CCD were approximated to a second-order polynomial equation and analysis of variance (ANOVA) was generated to determine individual linear, quadratic and interaction regression coefficients. The significances of polynomial relations were examined statistically by computing the F value at a probability (p) of 0.050. The percentage of contribution of each factor to the antioxidant activity of the extracts or to the phytochemical extraction was obtained from ANOVA and was calculated from the percentage of the standardised effect of the significance of each main effect or of each interaction and the total standardised effect of all main effects and interactions. Experiments to determine the adequacy of the model were done by using combinations of variables at different levels (within the experimental range).

Antioxidant Activity of Mango Seed Extracts

Multiple reaction characteristics and mechanisms as well as different phase localizations are usually involved in the assay of antioxidant capacity; for these reasons, no single assay will accurately reflect all of the radical sources or all antioxidants in a mixed or complex system such as a biological biowastes (Prior et al. 2005). In this work, the antioxidant activity of the extracts was evaluated by using different methods to obtain information about the capacity to deactivate radicals by hydrogen atom transfer (HAT) and by single electron transfer (SET). HAT-based methods

(such as β -carotene bleaching assay) measure the classical ability of an antioxidant to quench free radicals by hydrogen donation, and SET-based methods (such as DPPH[•] and ABTS^{•+} assays) detect the ability of a potential antioxidant to transfer one electron to reduce any compound, including metals, carbonyls, and radicals. SET and HAT mechanisms almost always occur together in all samples, with the balance determined by antioxidant structure and pH. All measurements were made on a Shimadzu UV-visible 160A double-beam spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a Hellma (Jamaica, USA) cell (path length 10^{-2} m).

The β -carotene bleaching method is based on the capacity of antioxidants to decrease oxidative losses of β -carotene in a β -carotene/linoleic acid system (Miller 1971). To induce autooxidation, the temperature was increased ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) and it was used oxygenated deionised water, which was generated by bubbling air into water for 60 min. In these conditions, the β -carotene molecules lose their conjugated double bonds and the loss in orange colour intensity was measured at 470 nm after incubation for 210 min. The antioxidant activity was expressed as antioxidant activity coefficient (AAC; González-Montelongo et al. 2010a). The repeatability standard deviation of the procedure was always <10%.

The capacity to scavenge the DPPH[•] radical was monitored according to a slightly modified version of the method used by Brand-Williams et al. (1995) at 515 nm after 15 min. The scavenging activity against the ABTS^{•+} radical was determined by a method (Armao et al. 2001) based on enzymatic generation of the radical by reaction of the ABTS with the horseradish peroxidase in sodium phosphate buffer pH 7.5, in the presence of hydrogen peroxide. The assay temperature was controlled at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the inhibition by the biowaste antioxidants was measured at 730 nm after 6 min. In both methods, a control with the addition of acetone/water (instead of extracts) was used. Results were expressed as grams of trolox equivalent antioxidant capacity/100 g mango seed on a dry matter basis (DW; González-Montelongo et al. 2010a). Calibration graphs ($r^2>0.963$) were constructed by plotting the absorbance against the trolox concentration at seven concentration levels (50–500 mg/l for DPPH[•] test and 20–250 mg/l for ABTS^{•+} test) analysed in triplicate. The procedure's repeatability was <5%.

Bioactive Compounds Content

The Folin–Ciocalteu method, to determine the total content of phenolic compounds (González-Montelongo et al. 2010a), was coupled with the use of an insoluble matrix (polyvinylpyrrolidone, PVPP) to analyse tannins (FAO/IAEA 2000). The tannins precipitate when PVPP is added to extracts (PVPP/phenolic compounds ratio, 100:1 w/w) and the supernatant only contains other than tannins; therefore, tannins were quantified by calculating the difference between

Table 1 Uncoded and coded values of the factors studied in the different experiments of the central composite design

Experiments ^a	Uncoded and coded (between parentheses) values of factors									
	n_{ext}		w_{ext}		w/v_{ext}		t_{ext} ^b		pH_{ext}	
Factorial points										
1	1	(-1)	95	(+1)	1:10	(-1)	120	(+1)	8	(+1)
2	3	(+1)	95	(+1)	1:10	(-1)	0	(-1)	3	(-1)
4	3	(+1)	5	(-1)	1:50	(+1)	120	(+1)	3	(-1)
6	1	(-1)	95	(+1)	1:50	(+1)	120	(+1)	8	(+1)
7	3	(+1)	95	(+1)	1:50	(+1)	120	(+1)	8	(+1)
8	1	(-1)	95	(+1)	1:10	(-1)	120	(+1)	3	(-1)
9	1	(-1)	95	(+1)	1:50	(+1)	120	(+1)	3	(-1)
10	3	(+1)	5	(-1)	1:10	(-1)	0	(-1)	3	(-1)
11	3	(+1)	95	(+1)	1:10	(-1)	120	(+1)	8	(+1)
12	1	(-1)	5	(-1)	1:10	(-1)	0	(-1)	8	(+1)
13	1	(-1)	5	(-1)	1:10	(-1)	0	(-1)	3	(-1)
15	3	(+1)	5	(-1)	1:50	(+1)	0	(-1)	8	(+1)
16	1	(-1)	5	(-1)	1:10	(-1)	120	(+1)	3	(-1)
17	3	(+1)	95	(+1)	1:10	(-1)	0	(-1)	8	(+1)
18	1	(-1)	95	(+1)	1:50	(+1)	0	(-1)	3	(-1)
19	3	(+1)	95	(+1)	1:50	(+1)	120	(+1)	3	(-1)
23	3	(+1)	95	(+1)	1:10	(-1)	120	(+1)	3	(-1)
26	3	(+1)	5	(-1)	1:10	(-1)	120	(+1)	3	(-1)
27	1	(-1)	95	(+1)	1:10	(-1)	0	(-1)	8	(+1)
28	1	(-1)	5	(-1)	1:50	(+1)	120	(+1)	3	(-1)
29	1	(-1)	95	(+1)	1:10	(-1)	0	(-1)	3	(-1)
31	1	(-1)	5	(-1)	1:50	(+1)	120	(+1)	8	(+1)
32	3	(+1)	95	(+1)	1:50	(+1)	0	(-1)	3	(-1)
34	1	(-1)	5	(-1)	1:50	(+1)	0	(-1)	3	(-1)
35	3	(+1)	5	(-1)	1:50	(+1)	120	(+1)	8	(+1)
37	1	(-1)	5	(-1)	1:10	(-1)	120	(+1)	8	(+1)
38	3	(+1)	95	(+1)	1:50	(+1)	0	(-1)	8	(+1)
39	3	(+1)	5	(-1)	1:50	(+1)	0	(-1)	3	(-1)
40	3	(+1)	5	(-1)	1:10	(-1)	120	(+1)	8	(+1)
41	1	(-1)	5	(-1)	1:50	(+1)	0	(-1)	8	(+1)
42	1	(-1)	95	(+1)	1:50	(+1)	0	(-1)	8	(+1)
43	3	(+1)	5	(-1)	1:10	(-1)	0	(-1)	8	(+1)
Centre points										
14	2	(0)	50	(0)	1:30	(0)	60	(0)	5.5	(0)
36	2	(0)	50	(0)	1:30	(0)	60	(0)	5.5	(0)
Axial points										
3	2	(0)	5	(-1)	1:30	(0)	60	(0)	5.5	(0)
5	2	(0)	50	(0)	1:30	(0)	120	(+1)	5.5	(0)
20	2	(0)	50	(0)	1:30	(0)	60	(0)	3	(-1)
21	1	(-1)	50	(0)	1:30	(0)	60	(0)	5.5	(0)
22	2	(0)	50	(0)	1:30	(0)	0	(-1)	5.5	(0)
24	2	(0)	50	(0)	1:10	(-1)	60	(0)	5.5	(0)
25	2	(0)	95	(+1)	1:30	(0)	60	(0)	5.5	(0)
30	2	(0)	50	(0)	1:30	(0)	60	(0)	8	(+1)
33	3	(+1)	50	(0)	1:30	(0)	60	(0)	5.5	(0)
44	2	(0)	50	(0)	1:50	(+1)	60	(0)	5.5	(0)

n_{ext} number of steps, w_{ext} water content in extractant, w/v_{ext} seed weight-to-solvent volume ratio in extractions, t_{ext} extraction time, pH_{ext} water pH, t_{ext} extraction time in the microwave

^aThe numbers (1–44) indicate the randomised order in which the experiments were developed

^bThe rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation)

total phenolic compounds and the phenols in the supernatant (FAO/IAEA 2000). They were expressed as grams of tannic acid equivalents (TAEs)/100 g DW mango seeds. Calibration curves ($r^2 > 0.990$) were constructed by plotting the absorbance against the tannic acid amount at seven levels analysed in triplicate (0.90–25 µg). The repeatability of the procedure was <5%.

The determination of condensed tannins (proanthocyanidins) is based on oxidative depolymerisation of proanthocyanidins in butanol-HCl (95:5 v/v, solvent/extract ratio, 5:1) (FAO/IAEA 2000). The presence of iron reagent (2% ferric ammonium sulphate in 2 N HCl) increases the reproducibility and sensitivity of the assay. The mixture was incubated at 97 °C for 60 min; the proanthocyanidin content (grams of leucoanthocyanidin equivalents (LEs)/100 g DW) was measured at 550 nm. Condensed tannin content was calculated by the formula (FAO/IAEA 2000).

$$\text{Proanthocyanidins (g/100 g)} = \left[\frac{(\text{Abs}_{550} \cdot 78 \cdot \text{dilution factor})}{\text{DW (\%)}} \right]$$

Statistical Analysis

Statgraphics-Plus software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA) was employed to generate design, ANOVA and to obtain the response surface plots. Simple linear correlation analysis was used to measure the correlation between the phenolic compound content and the antioxidant activity of the extracts.

Results and Discussion

Diagnostic checking of models on optimisation of the extraction parameters for obtaining high antioxidant mango seed extracts

In accordance with our previous experience in the treatment of mango seed, five factors that can potentially affect microwave-assisted extraction of mango seed to obtain extracts with high antioxidant activity were evaluated: number of steps, water content in the solvent mixture, seed weight-to-solvent volume ratio, extraction time and water pH. The minimum and maximum levels (Tables 2 and 3) given to each factor were chosen based on the experience of our research group and that of other authors in obtaining extracts with high antioxidant activity from mango seed (Kabuki et al. 2000; Puravankara et al. 2000; Berardini et al. 2004; Soong and Barlow 2004, 2006; Abdalla et al. 2007; Engels et al. 2009, 2010; Maisuthisakul and Gordon 2009; Dorta et al. 2011). Other factors implicated in the extraction were kept constant: type of extractant (a mixture

of acetone in water), extraction temperature (50 °C), volume of extractant (20 ml) and final volume of the extract (60 ml).

Tables 2 and 3 show the design matrix, which include the factors that influence microwave-assisted extraction and the antioxidant activity measured by using different methods (inhibition of β-carotene bleaching, scavenging of DPPH• and ABTS•+ free radicals) and of bioactive compounds (tannins and proanthocyanidins), respectively. The sequential listing of the experimental design parameters represents the statistically randomised order in which the experiments were undertaken. The comparison of the experimental values with the predicted values revealed that the two sets of values, for each antioxidant activity assay and for each bioactive compound, were very close (Tables 2 and 3). The coefficients of determination (R^2) indicated that the model (predicted values) explained between 82% and 92% of the variability observed in antioxidant activity and in proanthocyanidin content (experimental values) and 61% of the variability observed in tannin content (experimental values). The standard error of the estimates had a standard deviation of the residuals between 0.11 (proanthocyanidins, g LEs/100 g DW) and 50 (β-carotene bleaching, AAC) and the Durbin–Watson statistic tests indicated that, since the p value was greater than 0.050 for all the determinations, there was no indication of serial autocorrelation in the residuals, based on the order in which the residuals occur in the dataset.

Effects of the Extraction Factors on the Antioxidant Activity of Mango Seed Extracts

Water Content in the Solvent Mixture

ANOVA was used to estimate the statistical significance of the factors and interactions between them that had the greatest effect on obtaining extracts with high antioxidant capacity (Fig. 1). Among the factors studied, the water content in the acetone/water mixture used as extractant had the greatest impact on scavenging DPPH• and ABTS•+ radicals and on the extraction of bioactive compounds, accounting for 61–70% for the former and between 36 (tannins) for the latter. This factor had a more limited influence on the inhibition of β-carotene bleaching (around 18%). Some of the response-surface graphs, selected from amongst those obtained using the experimental model, is shown in Fig. 2. In these graphics, the variable with the greatest effect on the extraction, composition of the extractant, is shown along with the seed weight-to-solvent volume ratio. The capacity to inhibit β-carotene bleaching, to scavenge free radicals and to extract phenolic compounds (tannins and proanthocyanidins) increased when the water content in the extractant decreased, being the optimum water content in the extractant between 5% and 50% (high acetone content; Fig. 2). This conclusion is similar for all the parameters studied (Table 3).

Table 2 Design matrix in the central composite design and experimental (EV) and predicted (PV) values obtained for antioxidant activity in extracts from mango seed

Experiments ^a	Inhibition of β -carotene bleaching		Scavenging radical activity			
	AAC		DPPH [•]		ABTS ^{•+}	
			(g TE/100 g)		(g TE/100 g)	
	EV	PV	EV	PV	EV	PV
1	279±20	257	1.7±0.1	2.5	1.9±0.1	3.9
2	470±9	422	6.7±0.3	6.7	6.8±0.7	8.9
3	347±9	379	9.9±1.2	11	15±2	15
4	221±18	269	16±1	14	23±4	18
5	408±12	371	17±1	16	19±1	17
6	231±7	239	8.3±1.0	8.2	8.6±1.2	7.7
7	321±11	290	13±2	12	13±1	11
8	106±17	180	1.7±0.1	1.2	2.8±0.5	1.0
9	108±3	132	5.5±0.2	5.0	5.6±0.3	5.4
10	513±37	517	16±1	16	20±1	22
11	432±27	391	4.3±0.4	5.3	4.9±0.2	5.2
12	398±32	433	15±1	14	17±1	19
13	460±14	462	13±1	14	18±1	18
14	384±12	400	15±1	14	19±1	16
15	278±29	178	19±1	19	21±1	20
16	381±9	303	8.1±1.7	6.6	12±1	8.9
17	330±23	361	7.3±0.7	4.9	6.5±0.6	3.0
18	184±31	129	7.9±0.1	7.1	7.9±0.7	8.4
19	246±20	215	8.2±0.8	9.1	12±3	13
20	452±30	425	15±1	14	17±1	18
21	402±2	428	13±1	13	16±1	15
22	340±10	362	17±2	18	18±1	19.8
23	289±25	345	3.9±0.2	4.7	3.9±0.1	6.4
24	402±2	385	9.9±0.4	9.5	12±1	11
25	332±21	285	4.1±0.7	3.3	4.4±0.9	4.7
26	441±13	427	11±1	11	16±1	15
27	343±12	297	3.6±0.2	4.4	4.9±0.6	3.9
28	278±27	227	4.9±1.0	9.0	2.3±0.4	11
29	303±41	326	5.1±0.5	5.5	5.6±0.5	5.6
30	436±35	448	15±1	15	17±1	17
31	290±5	333	15±1	14	22±2	16
32	152±19	143	8.4±0.3	8.9	17±1	14
33	522±26	481	16±1	16	16±1	18
34	177±3	237	16±1	14	21±2	18
35	340±2	343	17±1	18	15±1	20
36	357±16	400	12±1	14	14±1	16
37	376±14	380	9.3±0.9	9.2	12±1	15
38	210±38	112	8.3±0.9	9.2	4.5±0.2	7.0
39	187±13	210	17±1	17	22±2	23
40	428±29	471	12±1	13	17±1	17
41	285±26	237	17±1	17	19±2	19
42	128±16	130	7.6±0.6	7.9	3.9±0.2	6.0
43	461±25	455	16±1	16	21±3	19
44	220±22	223	12±1	13	12±1	14
R^2	0.855		0.917		0.823	
Standard error of the estimate	50		1.5		3.0	
Durbin–Watson statistic	1.9 ($p=0.231$)		1.7 ($p=0.076$)		1.7 ($p=0.077$)	

Values based on freeze-dried mango seed and expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$)
AAC antioxidant activity coefficient, TE trolox equivalent capacity, EV experimental values, PV predicted values

^aThe numbers (1–44) indicate the randomised order in which the experiments were developed

Table 3 Design matrix in the central composite design and experimental (EV) and predicted (PV) values obtained for phenolic compounds quantified in extracts from mango seed

Experiments ^a	Tannins		Proanthocyanidins	
	(g TAEs/100 g)		(g LEs/100 g)	
	EV	PV	EV	PV
1	0.64±0.02	0.38	0.053±0.010	0.019
2	3.6±0.1	3.4	0.17±0.01	0.16
3	14±2	8.4	0.61±0.10	0.58
4	4.1±0.9	4.3	0.40±0.01	0.38
5	8.1±0.3	6.0	0.82±0.07	0.59
6	3.1±0.1	3.3	n.c.	0.028
7	4.5±0.4	3.5	0.062±0.014	0.081
8	0.84±0.11	0.10	0.012±0.005	-0.044
9	2.5±0.1	2.8	n.c.	0.047
10	4.6±0.1	5.2	1.1±0.1	1.1
11	1.6±0.1	1.3	0.074±0.012	0.16
12	2.2±0.4	3.6	1.0±0.1	1.0
13	3.6±0.5	3.7	1.1±0.1	0.97
14	6.0±0.6	6.9	0.61±0.06	0.62
15	2.2±0.5	3.6	0.41±0.01	0.43
16	1.4±0.3	2.3	0.51±0.05	0.65
17	2.6±0.1	2.6	0.16±0.01	0.24
18	3.2±0.3	2.5	0.17±0.04	0.18
19	3.6±0.3	3.7	0.013±0.002	0.047
20	6.4±0.8	6.1	0.53±0.04	0.65
21	5.9±0.6	5.5	0.70±0.14	0.59
22	5.3±0.7	6.6	0.54±0.04	0.73
23	1.7±0.1	1.7	0.066±0.006	0.049
24	4.8±0.3	4.3	0.99±0.13	0.76
25	2.0±0.4	7.0	0.039±0.006	0.032
26	3.3±0.7	3.5	0.88±0.06	0.90
27	1.8±0.3	1.5	0.25±0.01	0.24
28	3.8±0.6	3.8	0.32±0.04	0.23
29	2.0±0.2	1.5	0.15±0.02	0.22
30	6.4±0.4	6.0	0.83±0.09	0.68
31	3.5±0.3	4.3	0.24±0.01	0.21
32	4.5±0.4	3.7	0.17±0.01	0.033
33	6.7±0.3	6.3	0.59±0.05	0.67
34	2.5±0.6	3.5	0.42±0.04	0.42
35	3.7±0.8	4.0	0.39±0.01	0.42
36	4.7±0.3	6.9	0.48±0.03	0.62
37	2.8±0.2	2.6	0.54±0.09	0.72
38	3.4±0.2	3.1	0.13±0.01	0.028
39	4.1±0.1	4.2	0.42±0.03	0.43
40	1.4±0.1	3.0	1.1±0.1	1.0
41	4.6±0.5	3.6	0.37±0.02	0.37
42	3.1±0.3	2.6	0.12±0.02	0.12
43	6.0±0.4	4.4	1.2±0.1	1.2
44	5.6±1.1	5.3	0.25±0.01	0.44
<i>R</i> ²	0.606		0.913	
Standard error of the estimate	1.6		0.11	
Durbin–Watson statistic	2.0 (<i>p</i> =0.444)		2.1 (<i>p</i> =0.295)	

TAEs tannic acid equivalents, *LEs* leucoanthocyanidin equivalents, *n.c.* non-quantifiable data, *EV* experimental values, *PV* predicted values

Values based on freeze-dried mango seed and expressed as the mean ± standard deviation (*n*=3)

^aThe numbers (1–44) indicate the randomised order in which the experiments were developed

Fig. 1 Pareto charts for the standardised main and interactions in the central composite design for the (a) inhibition of β -carotene bleaching, (b) scavenging of DPPH $^{\bullet}$ free radical, (c) scavenging of ABTS $^{+ \bullet}$ free radical, (d) tannin content and (e) proanthocyanidin content. Vertical line indicates the statistical significance of the effects

The mixtures of acetone with water, containing a high percentage of organic solvent, have been reported as one of or the most effective solvents for extracting phenolic compounds from protein matrices, such as mango seed (Ribeiro et al. 2008; Dorta et al. 2011), since they appear to degrade the polyphenol–protein complexes (Kallithraka et al. 1995). Additionally, Dorta et al. (2011) described that using an acetone/water mixture was more efficient than acetone or water in obtaining extracts from mango seed with high antioxidant activity. Similar results were obtained by Yap et al. (2009) in star fruit biowastes, for which the water concentration in the acetone/water mixture was statistically the most significant factor ($p < 0.010$) in the extraction of phenolic compounds, between the studied. These authors found that either a high proportion of water in the solvent mixture or acetone (100%) did not contribute to obtaining a high recovery of phenolic compounds in the extracts.

Seed Weight-to-Solvent Volume Ratio in Extractions

The seed weight-to-solvent volume ratio in the extractions had the second greatest impact on how efficiently bioactive compounds, which are responsible for antioxidant activity, were extracted from mango seed (Fig. 1). This is due to the high impact that this factor (52%) had on the extract's capacity to prevent β -carotene bleaching. Moreover, this factor was statistically significant for the capacity to scavenge free radicals (factor contribution 5.1–13%) and for the phenolic compound extraction, being especially relevant for the extraction of tannins and proanthocyanidins accounting 19% and 20%, respectively. The capacity to inhibit lipid peroxidation (Fig. 2a) and to extract tannins (Fig. 2c) and proanthocyanidins (Fig. 2d) improved dramatically (90%, 55% and 95%, respectively) by decreasing the seed weight-to-solvent volume ratio from 1:50 to 1:30. However, the increase in the capacity to inhibit lipid peroxidation was much lower (5%) when the ratio decreased from 1:30 to 1:10 and this decrease caused a very negative impact on the extraction of tannins, decreasing their extraction a 45%. Thus, the optimum seed weight-to-solvent volume ratio can be fixed at 1:30 (v/v). It is important highlight that the interaction between the water content in the solvent mixture and the seed weight-to-solvent volume ratio influenced the proanthocyanidin extraction (accounting for 12%), being the

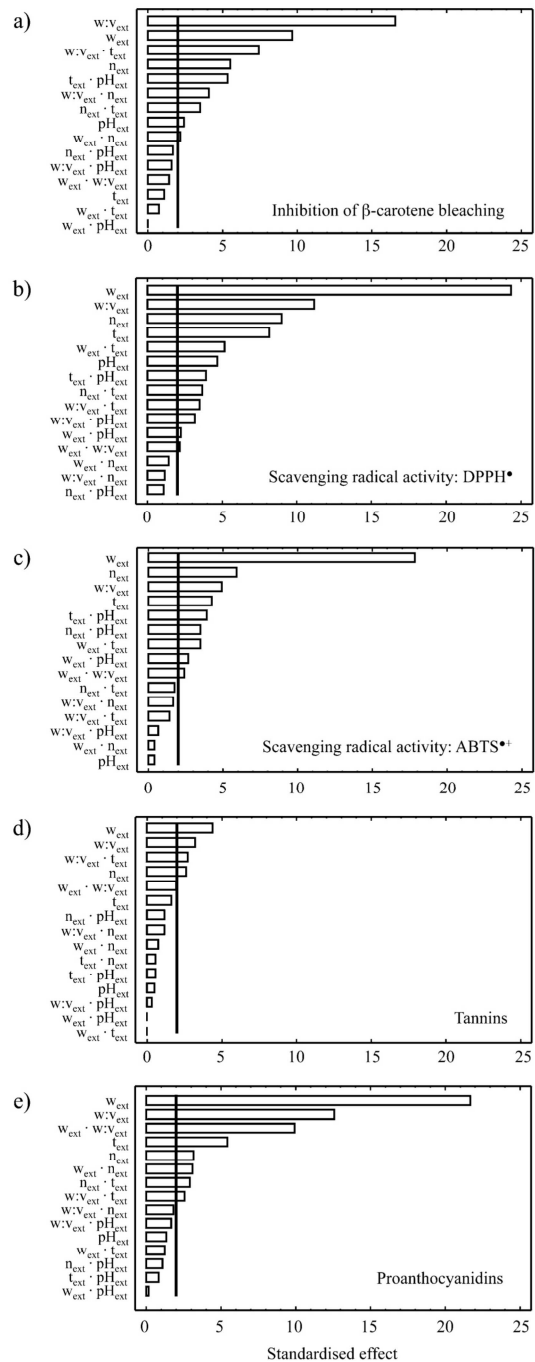
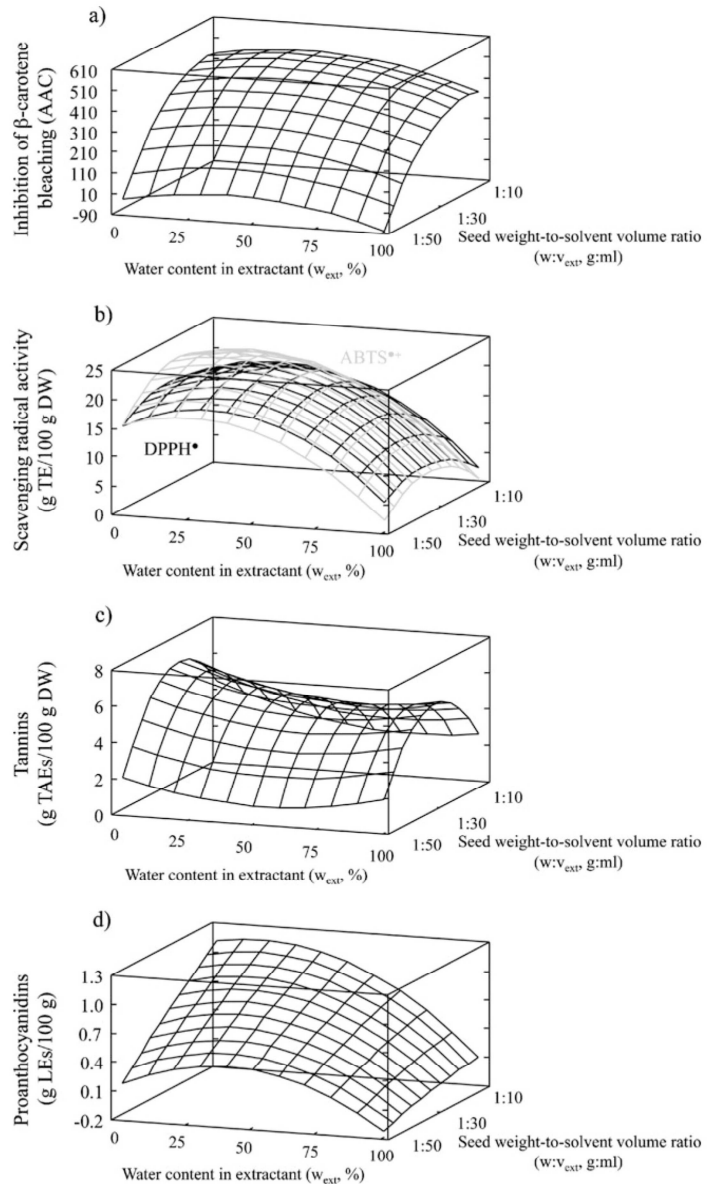


Fig. 2 Estimated response surfaces obtained by plotting the water content in extractant (w_{ext} , %) and seed weight-to-solvent volume ratio (w/v_{ext} , g/ml) for inhibition of β -carotene bleaching (a), scavenging activity (b), tannins content (c) and proanthocyanidins content (d) when fixing extraction time at 0 min, water pH in extractant at 8.0 and number of steps at 3



optimum extraction achieved at low water content and low ratio between seed weight and solvent volume.

Pinelo et al. (2005) have reported that solid-to-solvent ratio, optimised between 1:1 and 1:5 (w/v), played an important role in the efficient extraction of phenolic compounds from grape pomace and in the antiradical activity of extracts. The highest efficiency extraction was obtained when a high solid-to-solvent ratio (1:1, w/v) was employed.

Number of Steps

The number of steps influenced the extraction of bioactive compounds and the obtaining of extracts capable to inhibit β -carotene bleaching and to scavenge free radicals, with a 95% confidence level (Fig. 1). However, except for tannins (factor contribution, 13%), the impact of this factor on antioxidant activity and on phytochemical extraction was

practically negligible (1.2–8.3%) in comparison to the water content in the solvent mixture and to the seed weight-to-solvent volume ratio. The extraction efficiency improved generally by increasing the number of steps. This effect was also noticed in Fig. 3 which represent extraction time versus number of steps. This fact suggested that 3 was the optimal number of steps.

The number of steps is not a factor frequently studied for its relationship with the antioxidant activity of the extracts and with its bioactive compounds content, although it has been proven that is a crucial factor in the extraction processes (González-Montelongo et al. 2010a). González-Montelongo et al. (2010a) suggested that the optimum number of steps to obtain extracts with high antioxidant capacity and with high phenolic compound content from banana peel was 3. Xu et al. (2008) described that a second extraction with water from citrus peels was necessary since a considerable amount of phenolic compounds (with the consequent increase in antioxidant activity) were extracted from this residue by doing so. In the obtaining of antioxidant compounds (gallotannins, gallates, flavonols, xanthonenes, anthocyanins or benzophenone derivatives) from mango biowastes (bark, kernel, seed or peel), two to three extraction steps are usually used (Berardini et al. 2004; Soong and Barlow 2004, 2006; Barreto et al. 2008; Ribeiro et al. 2008; Engels et al. 2009, 2010).

Extraction Time

Extraction time significantly affected obtaining extracts that scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals and extracting proanthocyanidins, while it had not impact in the capacity of the extracts to prevent β -carotene bleaching and in the tannin content in the extracts (Fig. 1). Moreover, the impact of this factor on scavenging activity and on proanthocyanidins content was very low (4–7%). Zero minutes were the optimum in the microwave (therefore, the extraction process took place during homogenisation and centrifugation time) to obtain extracts with high antioxidant activity (Fig. 3). It has been proved that, to obtain extracts with high antioxidant activity and to extract phytochemicals from mango seeds, it is enough with homogenising the samples for 1 min. Therefore, the use of a microwave-assisted extractor is not necessary with the associate reduction of costs, rapidity and simplicity. The interaction between seed weight-to-solvent volume ratio and extraction time influenced the capacity of the extracts to prevent β -carotene bleaching (accounting for 10%) and the content of tannins in the extracts (14%; Fig. 1). Despite this, interaction also affected the capacity to scavenge DPPH[•] radical and the proanthocyanidins content in the extracts, its impact was very low (around 1%). Similarly, although the interaction between water content in the extractant and extraction time affected

the capacity of extracts to scavenge free radicals, its effect was negligible (3%). Moreover, the results of this work demonstrate that any degradation of phytochemical compounds occurs in the experimental conditions evaluated, even at prolonged extraction periods.

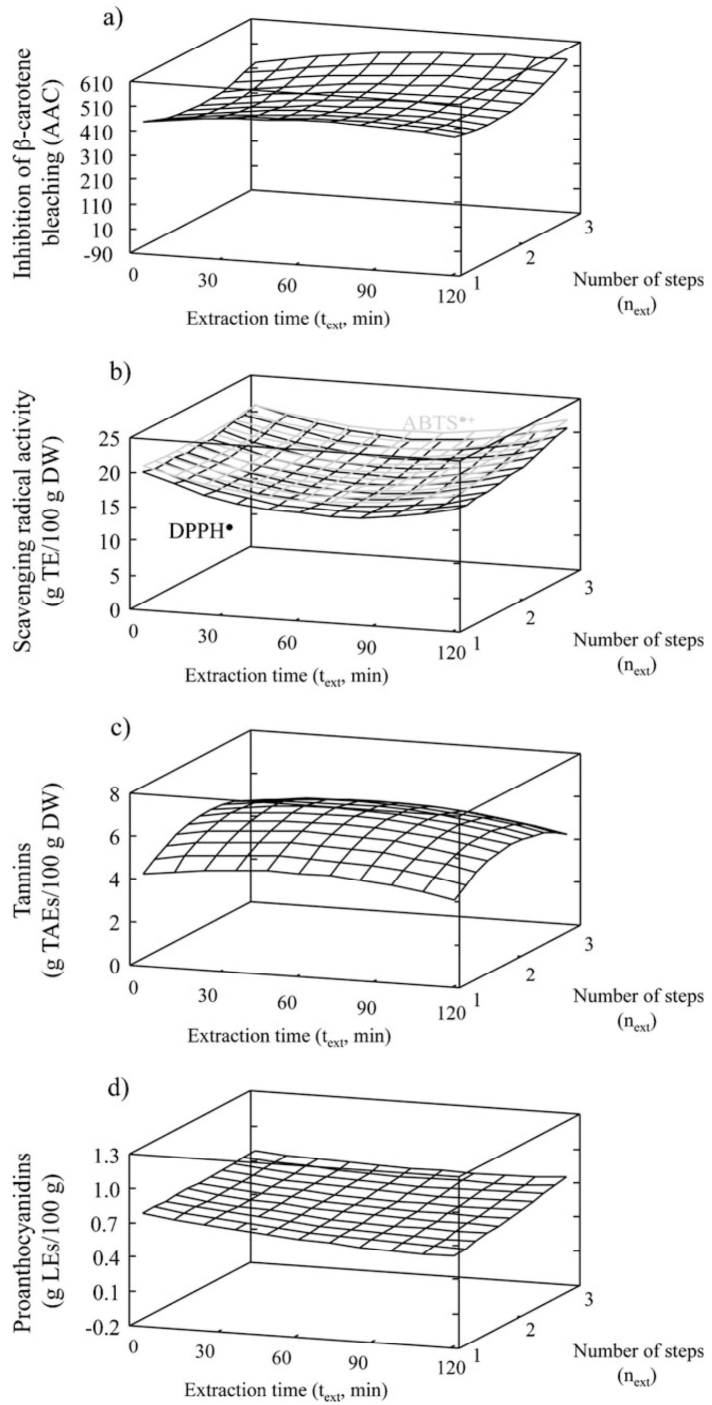
Similarly, the impact of extraction time on obtaining extracts, from banana peel, that inhibit β -carotene bleaching and that scavenge DPPH[•] radicals was very low (5–8%; González-Montelongo et al. 2010a), being the optimal time in the water bath 0 min (taking place the extraction during the homogenisation and the centrifugation). Xu et al. (2008) and Pinelo et al. (2005) also described that prolonging the extraction time did not improve antioxidant activity in citrus peel or grape pomace extracts, respectively. Yap et al. (2009) reported that increasing extraction time from 1.5 to 4.5 h led to a reduction of phenolic compounds in the 66% acetone extracts obtained from star fruit residues. Spigno et al. (2007) concluded that obtaining extracts rich in phenolics with high antioxidant activity from grape marc by-products could be more energy efficient using a high temperature (60 °C) for a short time (5 h), rather than a lower temperature (45 °C) for a longer time (15 h).

Water pH in the Extractant

The pH of the water in the solvent mixture can determine the degree of solubility of water-soluble compounds and also influence the possible solubilisation of the hydrolysable fraction of the phytochemical compounds. Nevertheless, amongst the factors studied, the water pH had the less important effect on the antioxidant activity and the bioactive compounds content of the extracts (Fig. 1). The water pH was statistically significant for the capacity to prevent lipid peroxidation (factor contribution 1.0%) and to scavenge DPPH[•] radicals (2.2%); therefore, its effect can be considered as negligible. A slight increase in the scavenging of DPPH[•] radicals with water pH (from 3.0 to 8.0) was found, thus, a pH of 8.0 was selected as the optimal for extracting antioxidants from mango seed.

Mylonaki et al. (2008) optimised the extraction of phenolic compounds from olive leaf and obtained that ethanol concentration in the extractant and extraction time mostly affected the extraction yield, while the impact of water pH on the extraction was low. However, it has been hypothesised that increasing water pH in the mixtures of water and organic solvents used as extractants might enhance polyphenol solubility by promoting the dissociation of the most acidic phenolic groups, making the polyphenols more polar (Mylonaki et al. 2008). An increase (around 50%) in the recovery of phenolic compounds was described by González-Montelongo et al. (2010b) when the water pH in the acetone/water extractant was higher than 4.0.

Fig. 3 Estimated response surfaces obtained by plotting the extraction time (t_{ext} , min) and number of steps (n_{ext}) for inhibition of β -carotene bleaching (a), scavenging activity (b), tannins content (c) and proanthocyanidins content (d) when fixing water content in extractant at 50%, water pH in extractant at 8.0 and seed weight-to-volume ratio at 1:10



The Optimal Extraction Conditions to Maximise Antioxidant Activity of Mango Seed Extracts

Using three extractions, a water content of 50% in the acetone/water mixture used as extractant, a seed weight-to-solvent volume ratio of 1:30, an extraction time of 0 min in the microwave (the rest of extraction process includes homogenisation and centrifugation time) and a water pH of 8.0 led to the highest antioxidant activity, measured as the capacity to inhibit lipid peroxidation and to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals. These conditions also contribute to obtain a high phenolic compound content in mango seed extracts. To determine the accuracy of the extraction procedure, extraction using optimal conditions and random (non-optimal) conditions were carried out in triplicate (Table 4). The experimental values for antioxidant capacity and phenolic compound content, in the optimal conditions, were quite close to the optimised values for these optimal conditions which confirmed that the model was valid. Moreover, the values obtained for both types of conditions indicate that the extraction of biowaste using non-optimal extraction conditions (for example, conditions that were not optimised for this specific plant material) can waste part of the antioxidant potential of these biowastes. For example, important discrepancies were found between the phenolic compound content reported by Abdalla et al. (2007) in their extraction with methanol/water (19:1, v/v) from mango seed (total phenolic compounds, 0.11 g gallic acid equivalents/100 g DW; tannins, 0.023 g TAEs/100 g DW) and those obtained in this work. They could probably be related, among other factors, to the different extraction conditions used to obtain these compounds from this plant matrix. Soong and Barlow (2006) evaluated three extraction types in the obtaining of 50% methanolic extracts with high antioxidant activity from

mango seed: (1) water bath extraction at 70 °C for 1 h, (2) water bath extraction (70 °C for 1 h) and hydrolysis at 35 °C for 16 h, and (3) water bath extraction (70 °C for 1 h) and hydrolysis at 85 °C for 2 h. The capacity to scavenge ABTS^{•+} radicals was affected remarkably by the extraction conditions, increasing 20% with increasing severity of hydrolysis.

With all the data obtained for the different extraction conditions evaluated ($n=132$), statistical analysis based on regression lines was carried out to determine if there was any correlation between antioxidant capacity and the phenolic compounds in the extracts. The statistical relationship between the capacity of the extracts to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals and proanthocyanidin content in them was moderately strong ($p=0.000$, $r>0.563$) and between the antiradical capacity and the tannin content was relatively weak ($p=0.000$, $r>0.423$). These correlations illustrate that these antioxidant compounds greatly affect the ability of the mango seed to scavenge free radicals. The correlation coefficients indicated a moderately strong relationship between the capacity to inhibit lipid peroxidation and the proanthocyanidin content ($p=0.000$, $r=0.650$) and a relatively weak relationship between this antioxidant activity and the tannin content ($p=0.002$, $r=0.270$). Therefore, it is possible that other non-phenolic compounds in the mango seed extracts affect the ability to prevent lipid peroxidation, probably fibre which antioxidant capacity has been previously reported (Larrauri et al. 1996).

Conclusions

Mango seed is a good and non-expensive source of phenolic compounds that can be used as food additives by the food industry. The economic feasibility of the extraction procedure

Table 4 Confirmatory trials of the optimal conditions to obtain mango seed extracts with high antioxidant activity

Response parameter	Optimal extraction conditions ^a Three steps, 50% water, 1:30 seed:solvent, 0 min, pH 8	Random (non-optimal) extraction conditions ^a one step, 95% water, 1:10 seed:solvent, 120 min, pH 3
Inhibition of β -carotene bleaching ^b		
AAC	400 \pm 6	107 \pm 11
Scavenging radical activity ^b		
DPPH [•] (g TE/100 g)	18 \pm 2	1.7 \pm 0.1
ABTS ^{•+} (g TE/100 g)	22 \pm 1	2.2 \pm 0.4
Phenolics compounds content ^b		
Tannins (g TAEs/100 g)	8.3 \pm 1.6	0.17 \pm 0.02
Proanthocyanidins (g LEs/100 g)	0.39 \pm 0.02	0.049 \pm 0.009

AAC antioxidant activity coefficient, TE trolox equivalent antioxidant capacity, TAEs tannic acid equivalents, LEs leucoanthocyanidin equivalents

^aThe extraction time (0 or 120 min) indicated corresponds to the time in the microwave; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenisation) and 20 min (centrifugation)

^bValues based on freeze-dried mango seed and expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$)

depends on finding the optimal extraction conditions to maximise the efficiency of the process. In this work, RSM was successfully employed to optimise the conditions to obtain extracts with high antioxidant activity from mango seed. The most important factor amongst the optimised conditions is the extractant composition (the water content in the mixture acetone/water), affecting the extract's capacity to scavenge DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals and the phenolic compounds content in the extracts. The seed weight-to-solvent volume ratio used in the extractions has an important effect on the capacity to prevent lipid peroxidation. Optimum values of the factors that influence the antioxidant capacity and the phenolic compound content in the extracts obtained from mango seed are: three steps, the mixture acetone/water (50:50, v/v) as extractant, a seed weight-to-solvent volume ratio of 1:30 (w/v), an extraction time of 0 min in the microwave (the rest of the extraction process includes homogenisation and centrifugation time) and a pH of 8.0. This work proves that using experimental design helps to visualise relationships between responses and extraction conditions, while also giving a clear idea of interactions between different extraction conditions.

Acknowledgements The Spanish "Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria" (INIA) awarded E. Dorta a PhD INIA grant. This research was supported through the R&D RTA2006-00187 project, also financed by the INIA.

References

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S., Ayad, E. H. E., & El-Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry*, *103*(4), 1134–1140.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, *73*, 239–244.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalder, B., & Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 5599–5610.
- Berardini, N., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *18*, 2208–2216.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30.
- Commission of the European Communities. (2000). *White Paper on Food Safety COM (1999) 719 Final*. Brussels: Commission of the European Communities.
- Dorta, E., Lobo, M. G., & González, M. (2011). Reutilization of mango by-products: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x.
- Dorta, E., Lobo, M. G., & González, M. (2012). Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, *45*, 261–268.
- Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y. Y., Carle, R., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7712–7718.
- Engels, C., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2010). Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high-speed counter-current chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 775–780.
- FAO/IAEA. (2000). *Quantification of tannins in tree foliage*. Vienna: Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture.
- González, M., & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, *2*, 1842–1866.
- González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010a). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, *71*, 347–355.
- González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010b). Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, *119*(3), 1030–1039.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., & Dosako, S. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry*, *71*, 61–66.
- Kallithraka, S., García-Viguera, C., Bridle, P., & Bakker, J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis*, *6*, 265–267.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., Borroto, B., & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *LWT- Food Science and Technology*, *29*(8), 729–733.
- Maisuthisakul, P., & Gordon, M. H. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*, *117*, 332–342.
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *48*(2), 91.
- Montgomery, D. C. (1991). *Design and analysis of experiments*. New York: Wiley.
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *392*, 977–985.
- Nithitanakool, S., Pithayanukul, P., Bavovada, R., & Sapparakorn, P. (2009). Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules*, *14*(1), 257–265.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., & Huang, F. (2008). Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*, *106*, 1264–1270.
- Périmo-Issartier, S., Zill-e-Huma, Z. H., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2011). Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 1020–1028.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 2111–2117.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods

- and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Puravankara, D., Boghra, V., & Sharma, R. S. (2000). Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(4), 522–526.
- Ribeiro, S. M. R., Barbosa, L. C. A., Queiroz, J. H., Knödler, M., & Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110(3), 620–626.
- Routray, W., & Orsat, V. (2011). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-011-0573-z.
- Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), 411–417.
- Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (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, 524–530.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200–208.
- Xu, G. H., Chen, J. C., Liu, D. H., Zhang, Y. H., Jiang, P., & Ye, X. Q. (2008). Minerals, phenolics compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science*, 73(1), C11–C18.
- Yap, C. F., Ho, C. W., Wan-Aida, W. M., Chan, S. W., Lee, C. Y., & Leong, Y. S. (2009). Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, 38(4), 511–520.

Improving the efficiency of antioxidant extraction from mango peel by using microwave-assisted extraction

Dorta, E., Lobo, M. G. & González, M.

Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

Plant Foods for Human Nutrition, doi: 10/1007/s11130-013-0350-4

Improving the Efficiency of Antioxidant Extraction from Mango Peel by Using Microwave-assisted Extraction

Eva Dorta · M. Gloria Lobo · Mónica González

© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The purpose of this study was to analyze the extraction efficiency of antioxidants from mango peel by comparing two techniques: microwave-assisted (MAE) and traditional solvent (TE) extraction. The number of extraction steps, water content in the extractant, peel weight-to-solvent volume ratio in extractions and extraction time all had an influence on obtaining extracts with high antioxidant capacity, but the extraction technique and the water content in the extractant were the factors with the greatest effect. Using three steps, a water content of 50 % in the ethanol:water extractant, an extraction time of 60 min and a weight-to-volume ratio of 1:10 or 1:50 (w/v) led to the highest antioxidant activity and phytochemicals content in extracts. The extraction time needed to extract phytochemicals from mango peel was similar when MAE and TE were used. However, the antioxidant capacity and phytochemical content were around 1.5–6.0 times higher in the extracts obtained by MAE.

Keywords *Mangifera indica* L. bio-wastes · Microwave-assisted extraction · Solvent extraction · Antioxidant capacity · Phenolic compounds

Abbreviations

AAC	Antioxidant activity coefficient
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid radical
ANOVA	Analysis of variance
CCD	Central composite design
CF	Contribution factor
DPPH [•]	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
DW	Dry matter basis
EV	Experimental values
LES	Leucoanthocyanidin equivalents
MAE	Microwave-assisted extraction
MW	Microwave
PV	Predicted values
<i>p</i>	Probability
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
SEE	Standard error of the estimates
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TAEs	Tannic acid equivalents
TE	Traditional solvent extraction
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity

Introduction

A lot of research is being focused on extracting natural and low-cost antioxidants from plants and their bio-wastes to replace synthetic additives [1]. There is a great deal of antioxidant activity in mango peel because of its richness in phytochemicals [2–6]. However, there are few studies searching for the best conditions to extract antioxidant compounds from mango peel. Although our research group [7] has determined the best solvent (ethanol:water, 50:50, (v/v)) and temperature (75 °C) to obtain extracts with high

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11130-013-0350-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Dorta · M. G. Lobo
Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60,
La Laguna 38200, Spain

M. González (✉)
Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC),
Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain
e-mail: monica.gonzalez@iqog.csic.es

Published online: 11 May 2013

 Springer

antioxidant activity from mango peel, the antioxidant compounds reported in this plant material have diverse structure, polarity and are distributed in various forms [2, 4]; therefore the effect of each extraction factor in the mass transfer of the process is not predictable and consequently it is essential to assay the effect of the different factors [8]. Moreover, the technique used to obtain extracts rich in antioxidant compounds will affect the extraction yield, selectivity, technical complexity, cost, environmental friendliness and safety. The traditional solvent extraction (TE) is time consuming and laborious and has low selectivity and/or low extraction yield. Today, more environmentally friendly, safer and more efficient and selective extraction technologies have been developed [9, 10]. Microwave-assisted extraction (MAE) is very useful in obtaining high-quality antioxidant extracts from a variety of plant matrices. Its advantages reside in microwave (MW) heating, which is rapid and effective because the heat is transferred directly to the material and, therefore, the phytochemical compounds are released more quickly and easily from plant cell compartments. Additionally, MAE processes use less solvent and considerably less time than TE [8, 11–13]. These advantages were proven in the extraction of phenolic compounds from wine lees [14], where extraction with MAE (peel weight-to-solvent volume ratio, 1:10 (w/v), water content in ethanol 25 % at 200 W) provided higher extraction yield (1.27 g dry residue/100 ml liquid extract) and phenolic compound content in the extracts (6.25 g gallic acid/100 mg in a dry matter basis (DW)) in a very short time (17 min) compared to TE at 40 °C (1.05 g dry residue/100 ml liquid extract, 6.10 g gallic acid/100 mg DW, 24 h). No information about the application of MAE for extracting phytochemical compounds or for obtaining extracts with high antioxidant activity from mango peel have been found. Therefore, the objective of this study was to analyze the extraction efficiency of antioxidants from mango peel by comparing two extraction techniques: TE and MAE. Moreover, optimal conditions used to obtain extracts with high antioxidant activity from mango peel, by using both extraction techniques, were proposed for the first time.

Materials and Methods

Plant Material

'Keitt' mango cultivars from the Canary Islands (Spain) were harvested (20–25 pieces) at the physiological maturity stage and allowed to ripen (consumption stage) at 18 °C and 80–90 % relative humidity for seven days. After ripening, the peel was separated with a sharp knife, freeze-dried (Christ alpha-1-4 LSC freeze-dryer, Osterode, Germany) and ground to a fine powder (<1 mm) with an IKA A11 mill (Staufen im Breisgau, Germany).

Extracting Antioxidants from Mango Peel

Mango peel powder was extracted with ethanol:water mixture (peel weight-to-solvent volume ratio and water content used in each experiment are shown in Table 1) at 75 °C [7, 15]. The mixture was homogenized with a Politron PT-6000 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) at $325 \times g$ for 1 min. Water pH (ranging between 3 and 8) was adjusted with hydrochloric acid or sodium hydroxide. Time (ranging between 0 and 120 min) of the extraction was modified depending on the experiment. The TE was carried out in a Grant Instruments Y38 (Cambridge, UK) water bath in hermetically sealed tubes which were covered with foil paper. The MAE was carried out in accordance with Dorta et al. [15] using an ETHOS 1 MW device (Milestone SRL, Sorisole, Italy) in closed Teflon vessels with a built-in safety valve. The temperature was continuously controlled with a direct temperature control device inserted in one of the extraction vessels and with a focused, high sensitivity infrared sensor, both interfaced to a microprocessor-controlled rotor positioning system. An initial power level of 500 W was set and the extractor software automatically regulated the microwave power accordingly, while the reaction temperature remained constant at 75 °C throughout the extraction process.

Experimental Design and Statistical Analysis

Statgraphics-Plus software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA) was employed to generate a design with perform regression analysis and obtain the response surface plots.

A '2⁵+star' central composite design (CCD) was projected on a face-centered star design with two center points. The factors (number of extractions, water content in the extractant, peel weight-to-solvent volume ratio in extractions, extraction time, and water pH) were set at three separate coded levels (Tables 1, 2 and 3). The minimum and maximum levels given to each factor were chosen based on our experience [7, 15] and that of other authors in obtaining extracts with high antioxidant activity from mango peel by using TE [3–6, 16, 17]. The design consisted of 44 randomized runs in triplicate for each extraction technique. The antioxidant activity and the antioxidant compound content were chosen as the dependent variables. Analysis of variance (ANOVA) was generated to determine individual linear, quadratic and interaction regression coefficients. The significances of polynomial relationships were statistically examined by computing the *F*-value at a probability (*p*) of 0.050. The regression coefficients were then used to make statistical analysis and to generate contour maps of the regression models. Experiments to determine the adequacy of the model were done by using combinations of variables, at different levels within the experimental range.

Table 1 Design matrix in the central composite design and experimental (EV)^a and predicted (PV) values obtained for scavenging activity from mango peel extracts when the extraction was carried out with traditional (TE) and microwave-assisted (MAE) extraction

Ex ^b	n, w, w/v, t ^c , pH	DPPH [•] (g TEAC/100 g DW)				ABTS ^{•+} (g TEAC/100 g DW)			
		TE		MAE		TE		MAE	
		EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
Factorial points									
1	1, 95, 1:10, 120, 8	4.5±0.6	2.2	8.3±0.3	9	3.7±0.4	1.6	6±0.7	5.4
2	3, 95, 1:10, 0, 3	7.9±1.1	9.5	7.9±1.1	13	6.8±1.2	6.2	6.8±1.2	8.5
4	3, 5, 1:50, 120, 3	26±2	25	28±1	29	13±1	15	22±1	22
6	1, 95, 1:50, 120, 8	10±1	11	16±1	17	6.8±0.3	9.2	11±1	12
7	3, 95, 1:50, 120, 8	20±2	13	23±2	21	15±1	11	17±4	15
8	1, 95, 1:10, 120, 3	4.3±0.4	4	7.9±0.2	12	3±0.2	3.7	6±0.1	7.8
9	1, 95, 1:50, 120, 3	9.1±2.3	14	17±1	19	6.8±1.2	11	13±1	13
10	3, 5, 1:10, 0, 3	26±2	24	26±2	24	18±1	17	18±1	18
11	3, 95, 1:10, 120, 8	3.8±1.1	8.1	23±5	21	3.8±0.5	4.7	12±1	12
12	1, 5, 1:10, 0, 8	11±2	14	11±2	12	7.5±1.8	9.8	7.5±1.8	8.5
13	1, 5, 1:10, 0, 3	9±1.1	11	9.0±1.1	10	5.9±1	8.9	5.9±1	7.9
15	3, 5, 1:50, 0, 8	26±1	24	26±1	24	14±1	15	14±1	15
16	1, 5, 1:10, 120, 3	11±1	10	17±1	15	7.8±0.5	7.2	12±1	12
17	3, 95, 1:10, 0, 8	12±1	9.2	11±1	11	0.28±0.04	3.8	0.28±0.04	5.6
18	1, 95, 1:50, 0, 3	10±1	7.9	10±1	7.5	6.3±0.6	4.8	6.3±0.6	5.7
19	3, 95, 1:50, 120, 3	19±2	16	22±1	23	17±1	14	16±1	17
23	3, 95, 1:10, 120, 3	10±1	10	30±6	24	8.2±0.5	8.3	18±1	16
26	3, 5, 1:10, 120, 3	21±2	22	28±2	30	15±1	15	23±2	24
27	1, 95, 1:10, 0, 8	1.2±0.2	2.2	1.2±0.2	0.068	1.1±0.1	0.058	1.1±0.1	0.093
28	1, 5, 1:50, 120, 3	18±1	17	24±5	22	11±1	8.5	19±1	15
29	1, 95, 1:10, 0, 3	5.3±0.1	2	5.3±0.1	1.9	3.8±0.4	0.89	3.7±0.4	2.2
31	1, 5, 1:50, 120, 8	17±2	16	24±1	24	8.9±0.8	8.8	17±1	16
32	3, 95, 1:50, 0, 3	12±1	12	12±1	10	8.7±0.1	9.3	8.7±0.1	8.1
34	1, 5, 1:50, 0, 3	12±1	14	12±1	16	7.8±0.3	7.5	7.8±0.3	8.1
35	3, 5, 1:50, 120, 8	16±2	24	29±2	31	12±1	14	23±4	23
37	1, 5, 1:10, 120, 8	8.8±1	10	16±1	16	6.1±0.9	6.7	13±1	13
38	3, 95, 1:50, 0, 8	7.2±1.2	10	7.2±1.3	9.4	8.1±0.7	7.6	8.1±0.7	6.3
39	3, 5, 1:50, 0, 3	23±3	23	23±3	22	15±2	15	15±2	14
40	3, 5, 1:10, 120, 8	25±1	22	27±2	31	11±1	13	21±1	24
41	1, 5, 1:50, 0, 8	18±1	15	18±1	19	9.5±1.5	8.9	9.5±1.5	9.9
42	1, 95, 1:50, 0, 8	6.5±0.1	7.1	6.5±0.1	6.5	5.5±0.5	4.7	5.5±0.5	4.7
43	3, 5, 1:10, 0, 8	27±3	26	27±3	25	22±1	17	22±1	18
Center points									
14	2, 50, 1:30, 60, 5.5	19±1	19	25±2	22	13±1	15	14±1	15
36	2, 50, 1:30, 60, 5.5	20±4	19	21±1	22	18±4	15	17±2	15
Axial points									
3	2, 5, 1:30, 60, 5.5	22±1	19	23±1	20	15±1	12	14±1	13
5	2, 50, 1:30, 120, 5.5	15±3	14	24±2	23	19±5	15	16±1	16
20	2, 50, 1:30, 60, 3	23±1	23	23±3	23	14±3	15	21±1	21
21	1, 50, 1:30, 60, 5.5	17±3	16	20±1	19	11±1	12	11±1	13
22	2, 50, 1:30, 0, 5.5	13±1	13	13±1	15	11±2	14	11±2	9.4
24	2, 50, 1:10, 60, 5.5	20±5	20	20±3	23	16±2	16	19±2	13
25	2, 95, 1:30, 60, 5.5	5.2±0.5	8.5	7.1±1.4	11	3.8±0.3	6.7	6.8±0.9	6.4
30	2, 50, 1:30, 60, 8	23±1	23	23±2	23	15±3	14	20±1	20

Table 1 (continued)

Ex ^b	n, w, w/v, t ^c , pH	DPPH* (g TEAC/100 g DW)				ABTS* ⁺ (g TEAC/100 g DW)			
		TE		MAE		TE		MAE	
		EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
33	3, 50, 1:30, 60, 5.5	22±2	23	26±4	28	22±2	17	21±2	19
44	2, 50, 1:50, 60, 5.5	23±3	23	28±1	25	19±2	19	20±2	15
R ²		0.848		0.831		0.809		0.863	
Standard error of estimate		3.0		4.0		2.6		2.5	

n number of extractions (1–3); w water content in extractant (5–95 %); w/v peel weight-to-solvent volume ratio in extractions (1:10–1:50, g/ml); t extraction time (0–120 min); pH water pH (3–8); TEAC trolox equivalent antioxidant capacity

^a Values based on freeze-dried mango peel and expressed as the mean±standard deviation (n=3)

^b The numbers (1–44) indicate the randomized order in which the experiments were developed

^c t_{ext} corresponds to the extraction time in the microwave or water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenization) and 20 min (centrifugation)

Antioxidant Activity and the Phytochemicals Content of the Mango Peel Extracts

The capacity to scavenge free radicals was determined by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH*) [18, 19] and the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid radical (ABTS*⁺, Sigma-Aldrich, Spain) [19, 20]. The results were expressed as grams of TEAC (Trolox (Sigma-Aldrich, Spain) equivalent antioxidant capacity)/100 g DW mango peel [19]. The capacity of antioxidants to inhibit lipid peroxidation was evaluated with the decrease of the β-carotene oxidation (Sigma) in a β-carotene/linoleic acid (Sigma) emulsion [19, 21] and by using a modified assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [19], expressed as antioxidant activity coefficient (AAC) and inhibition ratio (IP, %), respectively.

The Folin-Ciocalteu method for total phenolic compounds [19] was coupled with the use of an insoluble matrix (polyvinylpyrrolidone, PVPP; Sigma) to analyze tannins [7] and the results were expressed as grams tannic acid equivalents (TAEs)/100 g DW mango peel. The determination of proanthocyanidins was measured at 550 nm and expressed as grams leucoanthocyanidin equivalents (LEs)/100 g DW mango peel [7].

All determinations were based on spectrophotometric measurements (UV-visible 160A spectrophotometer; Shimadzu, Kyoto, Japan) and done in triplicate.

Results

Effect of Extraction Factors on the Free Radical Scavenging Capacity of Mango Peel Extracts

Obtaining extracts with capacity to scavenge free radicals was greatly influenced by the water content in the extractant

mixture (contribution factor (CF) of 31–51 %; $p=0.000$) and by the number of extractions (CF of 28–33 %; $p=0.000$), for both extraction techniques (Table 1). The time variable had the third greatest impact on the antioxidant capacity of extracts obtained by MAE (around 26–30 %; $p=0.000$), however, the time did not significantly affect the capacity in extracts obtained by TE ($p\geq 0.058$). The peel weight-to-solvent volume ratio influenced obtaining extracts that scavenge DPPH* and ABTS*⁺ radicals in both extraction techniques; however, the impact of this factor on scavenging capacity was practically negligible (CF between 3 and 8 %; $p\leq 0.003$) in comparison to water content and number of extractions. The water pH in the solvent mixture did not affect ($p>0.050$) the radical scavenging capacity of the extracts.

The extraction efficiency was improved by decreasing the water content in the water:ethanol mixture and the optimum water content was between 5 and 50 % (Fig. 1a and b). Otherwise, the increase in the number of extractions increased the ability of extracts to scavenge free radicals. Three extractions is the optimum condition as it increases the number of extracts with high antiradical activity by 30–60 % compared to using only one extraction step. These results are similar for both extraction techniques evaluated. In MAE, antioxidant activity was improved by increasing time; the optimum time was found to be 60 min. In TE, a very slight decrease in antioxidant capacity with an increase in the peel-to-solvent ratio was found; thus, a ratio of 1:50 (w/v) was selected as optimal for extracting antiradical antioxidants. Nevertheless, in MAE the capacity to scavenge ABTS*⁺ radicals showed some improvement (around 15 %) when a ratio of 1:30 (w/v) was chosen. Despite the similar impact of the different factors studied on the antiradical activity for the two extraction techniques, the extracts obtained using MAE had higher activity than extracts obtained by TE, ranging between 1.2 to 6 times.

Table 2 Design matrix in the central composite design and experimental (EV)^a and predicted (PV) values obtained for inhibition of lipid peroxidation from mango peel extracts when the extraction was carried out with traditional (TE) and microwave-assisted (MAE) extraction

Ex ^b	n, w/v, t ^c , pH	Inhibition of β -carotene bleaching (AAC)				TBARS (IP %)			
		TE		MAE		TE		MAE	
		EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
Factorial points									
1	1, 95, 1:10, 120, 8	497±23	419	477±7	478	32±3	19	38±3	34
2	3, 95, 1:10, 0, 3	336±31	365	336±31	346	36±5	42	36±5	50
4	3, 5, 1:50, 120, 3	374±24	378	373±14	370	34±5	33	68±4	54
6	1, 95, 1:50, 120, 8	215±5	295	334±9	366	25±1	25	18±1	22
7	3, 95, 1:50, 120, 8	377±31	298	383±25	374	27±3	28	32±6	31
8	1, 95, 1:10, 120, 3	509±37	539	508±6	536	26±4	26	36±4	35
9	1, 95, 1:50, 120, 3	301±28	349	372±15	382	11±2	26	6±1.3	15
10	3, 5, 1:10, 0, 3	685±9	644	685±9	658	88±1	87	88±1	78
11	3, 95, 1:10, 120, 8	341±27	451	653±19	584	27±4	36	60±9	57
12	1, 5, 1:10, 0, 8	398±31	513	398±31	481	52±13	69	52±13	61
13	1, 5, 1:10, 0, 3	485±37	494	485±37	498	71±7	71	71±7	68
15	3, 5, 1:50, 0, 8	424±8	453	424±8	429	4.9±0.4	11	4.9±0.4	18
16	1, 5, 1:10, 120, 3	541±22	542	590±11	553	52±13	74	95±1	96
17	3, 95, 1:10, 0, 8	234±49	238	234±49	279	41±5	35	41±5	44
18	1, 95, 1:50, 0, 3	98±11	105	98±11	121	18±2	14	18±2	5.8
19	3, 95, 1:50, 120, 3	400±7	364	392±3	365	51±6	35	10±2	23
23	3, 95, 1:10, 120, 3	638±16	583	601±15	616	46±8	49	78±4	58
26	3, 5, 1:10, 120, 3	624±18	654	684±5	686	88±1	95	92±1	100
27	1, 95, 1:10, 0, 8	176±31	169	176±31	146	27±3	24	27±3	26
28	1, 5, 1:50, 120, 3	328±16	294	337±26	334	17±4	26	54±3	54
29	1, 95, 1:10, 0, 3	316±29	283	316±29	239	32±6	24	32±6	31
31	1, 5, 1:50, 120, 8	364±40	373	386±22	394	31±5	23	58±2	59
32	3, 95, 1:50, 0, 3	141±31	157	141±31	132	23±4	18	24±5	9.4
34	1, 5, 1:50, 0, 3	287±22	258	287±22	315	13±2	12	13±2	21
35	3, 5, 1:50, 120, 8	421±11	445	412±5	456	10±1	23	63±5	60
37	1, 5, 1:10, 120, 8	600±12	555	619±12	572	51±7	65	93±2	93
38	3, 95, 1:50, 0, 8	80±19	97	80±19	106	18±2	17	18±2	13
39	3, 5, 1:50, 0, 3	352±25	380	352±25	378	6.2±1.5	14	6.2±1.5	16
40	3, 5, 1:10, 120, 8	665±16	655	689±14	730	86±1	80	91±1	100
41	1, 5, 1:50, 0, 8	379±35	344	379±35	340	26±4	15	26±4	22
42	1, 95, 1:50, 0, 8	76±17	57	76±17	69	14±2	19	14±2	9.2
43	3, 5, 1:10, 0, 8	748±19	651	748±19	668	92±1	78	92±1	71
Center points									
14	2, 50, 1:30, 60, 5.5	615±13	607	650±18	608	36±8	56	92±1	83
36	2, 50, 1:30, 60, 5.5	636±13	607	650±15	607	36±7	56	92±1	83
Axial points									
3	2, 5, 1:30, 60, 5.5	510±8	553	524±5	507	85±2	60	88±3	66
5	2, 50, 1:30, 120, 5.5	615±44	615	643±4	653	80±1	53	93±2	79
20	2, 50, 1:30, 60, 3	625±17	649	639±19	665	77±2	72	92±1	95
21	1, 50, 1:30, 60, 5.5	580±7	561	582±16	594	54±4	46	88±2	88
22	2, 50, 1:30, 0, 5.5	481±48	491	481±48	491	37±4	46	37±4	56
24	2, 50, 1:10, 60, 5.5	620±13	660	516±5	642	60±8	61	89±2	91
25	2, 95, 1:30, 60, 5.5	409±16	374	300±10	337	23±4	38	7.1±1.6	33
30	2, 50, 1:30, 60, 8	642±5	626	666±6	661	73±7	67	93±1	95

Table 2 (continued)

Ex ^b	n, w, w/v, t ^c , pH	Inhibition of β -carotene bleaching (AAC)				TBARS (IP %)			
		TE		MAE		TE		MAE	
		EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
33	3, 50, 1:30, 60, 5.5	610±26	637	670±6	678	57±9	55	93±1	97
44	2, 50, 1:50, 60, 5.5	497±65	466	552±7	446	39±2	27	51±3	54
R ²		0.926		0.938		0.807		0.879	
Standard error of estimate		53		49		12		12	

n number of extractions (1–3); *w* water content in extractant (5–95 %); *w/v* peel weight-to-solvent volume ratio in extractions (1:10–1:50, g/ml); *t* extraction time (0–120 min); *pH* water pH (3–8); *AAC* antioxidant activity coefficient; *TBARS* thiobarbituric acid reactive substances test; *IP* inhibition ratio

^a Values based on freeze-dried mango peel and expressed as the mean±standard deviation (*n*=3)

^b The numbers (1–44) indicate the randomized order in which the experiments were developed

^c *t*_{ext} corresponds to the extraction time in the microwave or water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenization) and 20 min (centrifugation)

Effect of Extraction Factors on the Capacity to Inhibit Lipid Peroxidation of Mango Peel Extracts

Among the factors studied, peel-to-solvent ratio and water content had the greatest impact on the capacity to inhibit lipid peroxidation in both extraction techniques evaluated (Table 2), accounting for 32–47 % ($p=0.000$) for the previous and between 19 and 32 % ($p=0.000$) for the latter. The third factor that influenced the antioxidant capacity was time ($p\leq 0.006$), although it had a greater effect in MAE (CF between 15 and 22 %) than TE (2–14 %). The extraction was only slightly influenced by the number of extractions ($p=0.000$), with an effect ranging between 2.6 and 5.9 %. The antioxidant capacity was not affected by water pH in the extractant.

In both extraction techniques, the capacity to inhibit lipid peroxidation was between 22 and 95 %, when the peel-to-solvent ratio decreased from 1:50 to 1:10 (w/v) and a ratio of 1:10 (w/v) was selected as optimum. In general, the capacity to inhibit β -carotene bleaching and TBARS formation increased when the water content increased from 5 to 50 % and decreased when the water content was higher than 50 % (Fig. 1d, e). For MAE and TE, an increase of time (from 0 to 60 min) increased the antioxidant capacity of the extracts. When the number of extraction steps was three, the capacity of the extracts to inhibit lipid peroxidation was slightly higher. In the β -carotene assay, the antioxidant capacity of the extracts obtained by MAE was slightly higher (from 1.1 to 1.5 times) than that obtained by TE; nevertheless, in the TBARS test the difference between the techniques was larger, 1.2–3 times higher in MAE than in TE.

Effect of Extraction Factors on the Content on Phytochemical Compounds of Mango Peel Extracts

The factors that had the highest effect on obtaining extracts with high tannin content (Table 3) were water content (CF between 39 and 59 %; $p=0.000$) and number of extractions (CF of 25 %; $p=0.000$). The peel-to-solvent ratio was statistically significant ($p\leq 0.005$) for obtaining extracts with high tannin content; however, its effect is practically negligible (CF from 1 to 1.9 %). The proanthocyanidin content in the mango peel extracts was influenced ($p=0.000$) by peel-to-solvent ratio (CF between 30 and 50 %), water content (CF 10–33 %), and number of extractions (CF 7–13 %). When MAE was used, the impact of time was important ($p=0.000$), its CF ranged between 7 and 27% on proanthocyanidin and tannin extraction, respectively; however, this factor had no effect when TE was used ($p\geq 0.086$). Tannin extraction efficiency was improved by decreasing water content; the optimum was between 5 and 50 % (Fig. 1c). When the extraction was carried out with 95 % water the tannin content decreased around 76–84 %. In the proanthocyanidin extraction, this factor had a greater effect in MAE than TE (Fig. 1f) and the highest extraction efficiency was obtained with the lowest ethanol content in the extractant. In both extraction techniques, the phytochemical content in extracts increased slightly when the peel-to-solvent ratio decreased from 1:50 to 1:10 (w/v) (Fig. 1c and Table 3). Therefore, a ratio between 1:30 and 1:10 (w/v) could be selected as optimum. Moreover, tannin and proanthocyanidin content increased from 15 to 50 % when the number of steps increased (Fig. 1f). The extraction of phytochemicals increased by increasing the time, using a maximum of between 60 and 120 min. Thus, three

Table 3 Design matrix in the central composite design and experimental (EV)^a and predicted (PV) values obtained for bioactive compounds from mango peel extracts when the extraction was carried out with traditional (TE) and microwave-assisted (MAE) extraction

Ex ^b	n, w, w/v, t ^c , pH	Tannins (g TAEs/100 g DW)				Proantocyanidins (g LEs/100 g DW)			
		TE		MAE		TE		MAE	
		EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
Factorial points									
1	1, 95, 1:10, 120, 8	1.2±0.1	0.32	2.2±0.2	1.9	40±7	33	38±7	36
2	3, 95, 1:10, 0, 3	2.3±0.2	3	2±0.2	3.4	53±11	74	53±11	73
4	3, 5, 1:50, 120, 3	8.7±0.4	8.8	11±1	11	50±10	55	133±15	122
6	1, 95, 1:50, 120, 8	2.7±0.5	3.5	4.7±0.1	5.4	45±4	38	34±4	26
7	3, 95, 1:50, 120, 8	5.8±0.3	4.1	8.4±0.6	7.1	47±7	34	42±6	35
8	1, 95, 1:10, 120, 3	1.1±0.8	1	2.4±0.3	2.8	51±4	56	67±10	65
9	1, 95, 1:50, 120, 3	2.9±0.2	4.6	5.9±0.5	6.1	23±3	56	14±1	35
10	3, 5, 1:10, 0, 3	10±1	9.2	9.4±0.3	8.6	145±14	143	146±14	144
11	3, 95, 1:10, 120, 8	1.4±0.4	2.5	6.3±0.6	6	41±5	71	74±14	76
12	1, 5, 1:10, 0, 8	4.3±0.9	5.1	4.3±0.9	4.2	95±21	91	95±21	86
13	1, 5, 1:10, 0, 3	3.4±0.2	4.6	3.4±0.2	4.2	84±11	84	84±11	94
15	3, 5, 1:50, 0, 8	8±0.5	7.8	7.2±0.5	7	57±12	40	57±12	54
16	1, 5, 1:10, 120, 3	4.8±0.3	4.5	6.8±1.1	6.3	44±6	88	168±22	168
17	3, 95, 1:10, 0, 8	4.6±0.7	3.5	4.1±0.6	3.5	92±10	83	92±10	78
18	1, 95, 1:50, 0, 3	3.2±0.3	2.3	2.8±0.2	1.8	25±2	23	25±2	19
19	3, 95, 1:50, 120, 3	6±0.4	4.9	7.3±0.2	7.4	53±2	50	29±7	33
23	3, 95, 1:10, 120, 3	2.9±0.4	2.9	7.0±0.6	6.5	105±17	92	104±17	94
26	3, 5, 1:10, 120, 3	8.2±0.4	8.6	11±1	11	160±33	152	228±26	228
27	1, 95, 1:10, 0, 8	0.32±0.01	0.88	0.21±0.09	0.060	37±7	49	37±7	48
28	1, 5, 1:50, 120, 3	6.6±0.4	6.2	8.2±1.1	8.3	61±8	33	85±32	93
29	1, 95, 1:10, 0, 3	1.8±0.2	0.64	1.6±0.2	0.36	67±13	42	67±13	54
31	1, 5, 1:50, 120, 8	5.5±0.4	5.4	8.7±0.3	7.9	17±2	16	99±18	82
32	3, 95, 1:50, 0, 3	3.1±0.3	3.2	2.7±0.3	2.4	21±2	14	21±2	7.2
34	1, 5, 1:50, 0, 3	4.2±0.2	4.4	3.8±0.2	4.3	14±3	10	14±3	14
35	3, 5, 1:50, 120, 8	6.7±0.4	8.2	10±1	11	14±3	39	106±13	120
37	1, 5, 1:10, 120, 8	3.9±0.4	4.1	5.9±0.5	5.7	67±6	66	128±17	137
38	3, 95, 1:50, 0, 8	2.4±0.4	3.2	2.1±0.4	2.8	32±4	27	32±4	32
39	3, 5, 1:50, 0, 3	7±0.1	7.5	6.3±0.1	6.4	26±6	27	26±6	32
40	3, 5, 1:10, 120, 8	8.8±1.3	8.5	10±1	11	143±9	131	206±32	207
41	1, 5, 1:50, 0, 8	5.2±0.4	4.5	4.6±0.4	4.5	16±3	22	16±3	26
42	1, 95, 1:50, 0, 8	2.2±0.2	2.1	1.9±0.2	1.7	31±7	35	31±7	34
43	3, 5, 1:10, 0, 8	10±1	10	9.4±0.3	9	148±7	152	148±9	146
Center points									
14	2, 50, 1:30, 60, 5.5	8.6±0.5	8.3	9.6±1.6	9.1	80±11	67	71±7	62
36	2, 50, 1:30, 60, 5.5	9.1±1.1	8.3	11±2	9.1	70±14	67	68±15	62
Axial points									
3	2, 5, 1:30, 60, 5.5	9.1±0.5	7.9	10±1	8.6	42±10	52	145±16	132
5	2, 50, 1:30, 120, 5.5	7.3±2.9	6.5	8.3±0.4	8.3	80±6	60	56±5	64
20	2, 50, 1:30, 60, 3	10±1	10	10±1	9.9	72±15	80	86±17	78
21	1, 50, 1:30, 60, 5.5	7.3±1.1	6.9	7.6±0.2	8.8	57±10	59	31±3	26
22	2, 50, 1:30, 0, 5.5	5±0.6	6.1	4.5±0.5	5.1	30±3	54	30±3	26
24	2, 50, 1:10, 60, 5.5	6.1±0.4	6.8	7.9±0.9	8.1	129±23	109	87±8	92
25	2, 95, 1:30, 60, 5.5	1.5±0.1	3.9	2.4±0.3	4.8	34±6	29	53±10	69
30	2, 50, 1:30, 60, 8	9.8±0.8	10	9.1±1.0	9.9	79±21	75	59±3	75

Table 3 (continued)

Ex ^b	n, w, w/v, t ^c , pH	Tannins (g TAEs/100 g DW)				Proanthocyanidins (g LEs/100 g DW)			
		TE		MAE		TE		MAE	
		EV	PV	EV	PV	EV	PV	EV	PV
33	3, 50, 1:30, 60, 5.5	8.7±1.1	9.5	12±2	12	84±17	86	46±8	55
44	2, 50, 1:50, 60, 5.5	8.0±0.1	7.6	8.4±0.3	8.8	30±5	54	29±5	32
R ²		0.879		0.908		0.818		0.931	
Standard error of estimate		1.1		1.1		0.02		0.01	

n number of extractions (1–3); *w* water content in extractant (5–95 %); *w/v* peel weight-to-solvent volume ratio in extractions (1:10–1:50, g/ml); *t* extraction time (0–120 min); *pH* water pH (3–8); *TAEs* tannic acid equivalents; *LEs*, leucoanthocyanidin equivalents

^a Values based on freeze-dried mango peel and expressed as the mean±standard deviation (*n*=3)

^b The numbers (1–44) indicate the randomized order in which the experiments were developed

^c *t*_{ext} corresponds to the extraction time in the microwave or water bath; the rest of the extraction process includes, in all cases, 1 min (high-speed homogenization) and 20 min (centrifugation)

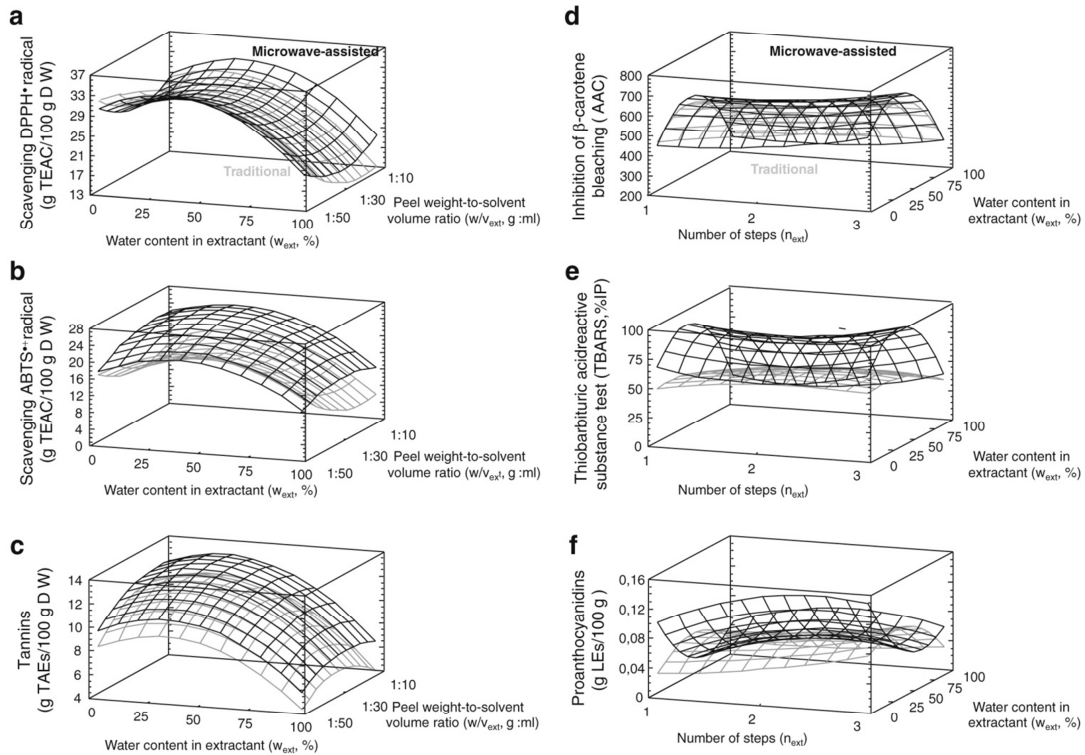


Fig. 1 Estimated response surfaces obtained by plotting the water content in extractant (w_{ext} , %) and peel weight-to-solvent volume ratio (w/v_{ext} , g/ml) for scavenging DPPH[•] radical (a), scavenging ABTS^{•+} radical (b), tannin content (c) when fixing extraction time at 60 min, water pH in extractant at 3 and three steps; the water content in

extractant (w_{ext} , %) and number of steps (n_{ext}) for inhibition of β -carotene bleaching (d), thiobarbituric acid reactive substance test (e), proanthocyanidins content (f) when fixing extraction time at 60 min, water pH in extractant at 5.5 and peel weight-to-volume ratio at 1:30

steps and 60 min were selected as the optimal for extracting phytochemicals from mango peel. The extraction yield was higher when mango peel extracts were obtained using MAE. The tannin and the proanthocyanidin content were 1.2–4.5 (Fig. 1c and Table 3) and 1.3–6.0 (Fig. 1f and Table 3) times higher, respectively.

Selection of the Conditions to Maximize Antioxidant Activity of Mango Peel

In both extraction techniques the optimum conditions were: three extraction steps, a water content of 50 % in the extractant, an extraction time of 60 min and a water pH of 3. However, the optimal peel-to-solvent ratio to obtain extracts that inhibit lipid peroxidation and have a high phytochemicals content was 1:10 (w/v) and the optimal ratio to obtain extracts with high capacity to scavenge DPPH• and ABTS•⁺ radicals was 1:50 (w/v).

When the experimental values (EV) were compared with the predicted values (PV), it could be concluded that the two sets of values, for each antioxidant activity assay (Tables 1 and 2) and for each phytochemical compounds (Table 3), were very close and that the model (PV) explained between 81 and 94 % of the variability observed in antioxidant activity and phytochemicals content (EV), as the coefficients of determination (R^2) revealed (Tables 1, 2 and 3). Moreover, to determine the accuracy of the extraction methods, three independent extractions were carried out using the newly established optimal conditions and non-optimal random conditions (see Table included as [Electronic Supplementary Material](#)). The EV for antioxidant capacity and bioactive compounds content, in the optimal conditions, were quite close to the PV which proved the validity of the model. The validity of the model was also confirmed by using the standard error of the estimates (SEE) and the Durbin-Watson statistic test. The SEE had a standard deviation of the residuals between 1.1 (tannins, g TAEs/100 g DW) and 0.02 (proanthocyanidins, g LEs/100 g DW) and the Durbin-Watson test indicated that there was no indication of serial autocorrelation in the residuals, based on the order in which the residuals occur in the dataset.

In both extraction techniques, the statistical relationship between the antioxidant activity with tannin content was moderately strong ($p=0.000$, $r>0.532$). Moreover, the correlation coefficients indicated a moderately strong relationship between the capacity to inhibit lipid peroxidation and the proanthocyanidin content ($p=0.000$, $r=0.521$) and a relatively weak relationship between these compounds with the capacity to scavenge free radicals ($p=0.000$, $r>0.352$).

Discussion

Most of the factors studied affected the antioxidant activity and phytochemical compounds content in the extracts. For TE and MAE, the water content greatly affected the efficiency of the extraction; therefore, the addition of water up to 50 % to ethanol enhances antioxidant capacity (Fig. 1). Similar results have been described in the extraction of phenolic compounds by MAE from *Portulaca oleracea* L. [22], from wine lees [14] where the optimum water content in the extractant was 10–40 %. The increased efficiency, when some water is added to ethanol, might be also related to the fact that the water swells the plant material, thereby increasing the surface area of the plant material in contact with the solvent [23]. Obtaining extracts with high capacity to scavenge radicals from mango peel was optimal when using a peel-to-solvent ratio of 1:50 (w/v), a result that was also obtained by Zhu et al. [22]. Nepote et al. [24] and Barreto et al. [5] confirmed that three steps were the optimum to extract antioxidants from peanut skins and from mango peel, respectively. In the extraction of phytochemicals from mango peel, the dielectric constant of the solvent increases by adding 50 % water to the extractant, which helps to absorb high MW energy, compared to pure ethanol, thus increasing the extraction efficiency [23]. Because MW quickly heats up the material, there is a much lower risk of thermal degradation, decomposition or oxidation of valuable plant constituents than in TE [25, 26].

Usually MAE requires considerably less extraction time than TE, although the extraction time necessary to extract phytochemicals from mango peel was similar in both techniques. However, the antioxidant capacity and phytochemical compounds content of the extracts from mango peel obtained by MAE was much higher than those obtained by TE. The efficiency of MW in the extraction process causes an easier release of phytochemical compounds from the plant material [23]. Sun et al. [27] observed that the structure of red raspberry after MAE was lesser than after TE by using scanning electron micrographs. MW irradiation resulted in the disruption of the physical structure of plant material because of the selective and localized heating of residual moisture, leading to a direct migration of the phytochemical components into the surrounding extractant. In the TE process, a heated solvent is slowly diffused through the plant material, thus dissolving and carrying away target compounds [27].

Large discrepancies were found between the phytochemicals content in mango peel reported by various authors with the obtained in this work. The phenolic compounds content in methanolic extracts (two extraction steps for 3 h, with *n*-hexane and three steps for 3 h with methanol) was 0.90–9.12 g GAE /100 g DW [5] and in ethanolic extracts was 7.01 g GAE /100 g DW (ethanol:water (4:1, v:v), sonication,

three days, room temperature) [17]. These differences confirm that in order to obtain extracts rich in antioxidants the conditions must be optimized.

Conclusions

All factors studied, except water pH, influenced the high antioxidant capacity in extracts from mango peel. The extraction technique and the water content were the most important factors, followed by peel-to-solvent ratio and number of steps and time. In the present study, the antioxidant activity and the phytochemicals content were higher in the extracts obtained by MAE than those obtained using TE, probably due to the fact that phytochemical compounds released more readily from the plant material because the physical structure of the material is disrupted by selective and localized heating of residual moisture in the freeze-dried mango peel.

Acknowledgments The Spanish INIA awarded Eva Dorta a PhD INIA grant. Mónica González would like to thank the Spanish National Research Council (CSIC) for a contract in the JAEdoc program, financed with the involvement of the European Social Fund (ESF). This research was supported through the RTA2006-00187 project, also financed by the INIA.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- European Union (1995) Directive 1995/2/EC of the European Parliament and of the Council of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners. Off J Eur Comm L61
- Schieber A, Berardini N, Carle R (2003) Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J Agric Food Chem 51:5006–5011
- Berardini N, Carle R, Schieber A (2004) Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 18:2208–2216
- Berardini N, Fezer R, Conrad J, Beifuss U, Carle R, Schieber A (2005) Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. J Agric Food Chem 53:1563–1570
- Barreto JC, Trevisan MTS, Hull WE, Erben G, de Brito ES, Pfundstein B, Wurtele G, Spiegelhalter B, Owen RW (2008) Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango (*Mangifera indica* L.). J Agric Food Chem 56:5599–5610
- Ribeiro SMR, Barbosa LCA, Queiroz JH, Knödler M, Schieber A (2008) Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Food Chem 110:620–626
- Dorta E, Lobo MG, González M (2011) Reutilization of mango by-products: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. J Food Sci 77:C80–C88
- González M, González V (2010) Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. Anal Methods UK 2:1842–1866
- Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G (2009) Effects of pressurized low polarity water extraction parameters on antioxidant properties and composition of cow cockle seed extracts. Plant Foods Hum Nutr 64:32–38
- Ghafoor K, AL-Juhaimi FY, Choi YH (2012) Supercritical fluid extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. Plant Foods Hum Nutr 67:407–414
- Pan Y, Wang K, Huang S, Wang H, Mu X, He C, Ji X, Zhang J, Huang F (2008) Antioxidant activity of microwave assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. Food Chem 106:1264–1270
- Desai M, Parikh J, Parikh PA (2010) Extraction of natural products using microwaves as a heat source. Sep Purif Rev 39:1–32
- Routray W, Orsat V (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. Food Bioprocess Technol 5:409–424
- Pérez-Serradilla JA, Luque de Castro MD (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. Food Chem 124:1652–1659
- Dorta E, Lobo MG, González M (2013) Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from mango seed. Food Bioprocess Technol 6:1067–1081
- Jiang IY, He S, Pan YJ, Sun CR (2010) Bioassay-guided isolation and EPR-assisted antioxidant evaluation of two valuable compounds from mango peels. Food Chem 119:1285–1292
- Kim H, Moon JY, Kim H, Lee DS, Cho M, Choi HK, Kim YS, Mosaddik A, Cho SK (2010) Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. Food Chem 121:429–436
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Technol 28:25–30
- González-Montelongo R, Lobo MG, González M (2010) The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. Sep Purif Technol 71:347–355
- Arnao MB, Cano A, Acosta M (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chem 73:239–244
- Miller HE (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 48:91
- Zhu H, Wang Y, Liu Y, Xia Y, Tang T (2010) Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. Food Anal Method 3:90–97
- Hemwimon S, Pavaasant P, Shotipruk A (2007) Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. Sep Purif Technol 54:44–50
- Nepote V, Grosso NR, Guzmán CA (2005) Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. J Sci Food Agric 85:33–38
- Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. Phytochem Anal 13:105–113
- Liaqid A, Palma M, Brigui J, Barroso CB (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. J Chromatogr A 1140:29–34
- Sun Y, Liao X, Wang Z, Hu X, Chen F (2007) Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Eur Food Res Technol 225:511–523

In vitro activities of mango (*Mangifera indica* L.) byproducts: Antioxidant and Antifungal properties

Dorta, E.^a, González, M.^b, Lobo, M. G.^a & Laich, F.^c

^aPost-harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

^bDepartment of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, Spanish National Research Council (CSIC), 28006 Madrid, Spain

^cUnidad de Microbiología Aplicada, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain

Abstract

Peel and seed mango (*Mangifera indica* L.) byproducts from three cultivars (Keitt, Sensation and Gomera-3) were tested for their antifungal and antioxidant properties. Antifungal activity was determined using the agar diffusion and broth micro dilution assays. The extracts were tested against 18 yeasts species associated with food spoilage and human pathogens (*Candida bracarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. parapsilopsis*, *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lodderomyces elongisporus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *P. kluyveri*, *P. ohmeri*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Sacharomycodes ludwigii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. bisporus*, *Z. microellipsoides* and *Z. rouxii*). Mango peel and seed extracts showed an antifungal activity against all the yeast species tested. In general, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) values were lower for seed extracts than for peel extracts. *P. ohmeri* and *Z. bisporus* were the most susceptible species (MIC: 0.1 mg GAE/mL) and *L. elongisporus* was the most resistant specie (MIC: 5 mg GAE/mL). Antifungal activity of seed extracts were significantly within cultivars in the 33% of the yeast species studied. Extracts obtained from cultivars Sensation and Gomera-3 have higher antifungal activity than extracts of cultivar Keitt, however these differences were not observed when peel extracts were used. Concerning bioactive compounds content, Sensation and Gomera-3 seed extracts had higher phenols concentration than cultivar Keitt, however no significant difference between cultivars was detected in peel extract. The 89-97% of total phenols were tannins. The antioxidant activities were determined as free radical-scavenging ability (DPPH[•] method) and by the capacity to inhibit lipid peroxidation (β -carotene bleaching method). The seed extracts of Keitt cultivar showed the lowest ability to scavenging DPPH[•] radical, nevertheless no significant difference between cultivars was detected in peel extract. On the other hand, the seed and peel extracts of Keitt cultivar showed the lowest antioxidant activity coefficient (ACC). In addition, principal component analysis (PCA) of the relationship between antimicrobial properties, bioactive compounds and antioxidant activity were performed. The PCA generated two principal components (PC1, PC2) with a cumulative explained variance of 62.9% of the total variance in byproducts extracts samples. PC1 (37.5%) was related with scavenging radicals capacity and PC2 (25.4%) was correlated with antifungal capacity. The results revealed the antiyeast effects against food spoilage and human pathogen microorganisms. This work also provide arguments for further investigation and suggested the potential applications of mango seed and peel extract or its polyphenolic compounds, as an antifungal agents in the pharmaceutical and food industry.

Keywords: *Mangifera indica* L., byproducts; Phenolic Compounds; Antioxidant; Antifungal; Yeast, Food Spoilage.

1. Introduction

Yeasts are the most important microorganisms involved in the fermentation processes of many foods such as wines, beers, cider, distilled spirits, bakery products, sake, cheese and other fermented foods. However, yeasts can also cause plant and animal diseases as well as undesirable changes in a wide range of foods.

Food spoilage is a serious problem for the food industry because it renders products unacceptable for human consumption resulting in economic losses (Loureiro, 2000). Nowadays the increased degree of processing and storage of foods have consequently an increment of yeast contamination (Stratford, 2006).

Food and beverage spoilage by yeasts are well documented in the literature. Fleet (2011) describes in detail the main ecological, physiological and biochemistry aspects. Yeasts can generally resist extreme conditions better than bacteria, they are often found in low pH products and products containing preservatives to such extent that bacteria cannot grow (Loureiro, 2000).

Food-grade antimicrobial compounds are routinely used for prolonging shelf-life and the preservation of food quality by inhibiting spoilage microorganisms (Goretti et al., 2009). Nevertheless, the search of new natural substances is increasing, in this context, the extracts of plants or extracts of byproducts offers scope for a new approach to food preservation.

Mangifera indica L. belongs to the Anacardiaceae family and is the only mango tree commonly cultivated in many tropical and subtropical regions. Mango byproducts have been studied for many years and a wide range of pharmacological properties have been reported (Shah et al., 2010). The mango cultivar the type of byproduct, the conditions of extractions and the extraction technique employed, affect significantly the bioactive compounds profile of the extracts and consequently their antioxidant capacity. Berardini et al. (2005) found important differences on 14 cultivars of mango analyzed. Thus, Tommy Atkins and Chok Anan cultivars showed the highest content in mangiferin (around 1250-1300 mg/kg dry matter) and Haden, Heidi and Tommy Atkins cultivars were characterized by high content in flavonoids (around 2700-3000 mg/kg dry matter). In this study, Tommy Atkins presented 12 times higher content in flavonol and xanthone glycosides

(4444.0 ± 198.33 mg/kg dry matter) than Mon Duen Gao cultivars (354.4 ± 4.5 mg/kg dry matter).

Several studies demonstrated the antibacterial activity of mango seed against gram-negative and gram-positive bacteria including food-borne, clinical isolates and enteropathogenic species (Kabuki et al., 2000; Stoilova et al., 2005; Abdullah et al., 2011; Jiamboonsri et al., 2011; Khammuang and Sarnthima, 2011; Rajan et al., 2011; Vaghasiya et al., 2011). Engels et al. (2009) extracted gallotannins from mango kernels (Kaew cultivar) and characterized the antimicrobial activity of these compounds against *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus aureus* and *S. warneri*. The inhibitory spectrum of gallotannins observed indicates a remarkable selectivity. *Bacillus* spp, *S. aureus* and *L. monocytogenes*, were highly sensitive to gallotannins, whereas growth of *E. coli* and *S. warneri* was only partial inhibited and *P. acidilactici* was resistant. Recent studies have determined the modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (Engels et al., 2011).

On the other hand, there are a few studies on the antibacterial activity of mango peel. Souto de Oliveira et al. (2011) investigated the antibacterial activity of mango peel ethanol extracts; the results showed that these extracts had not antibacterial activity at a concentration of 1024 µg/mL against three strains of *S. aureus*. Kim et al. (2010) determined the ability of mango peel extract to inhibit the proliferation of different cancer cells lines.

Currently there are a few data regarding the antifungal, especially “antiyeast”, properties of mango byproducts. Cojocarú et al. (1986) and Droby et al. (1986) analyzed the antifungal activity of mango peel compounds against *Alternaria (Alt.) alternata*. Raman et al. (1997) analyzed the mango seed oil against *Saccharomyces cerevisiae* and showed the capacity to induce the yeast growth. Negi et al. (2002) showed the inhibition spore germination properties of mango sap (latex) against *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* spp. Stoilova et al. (2005) demonstrated, in agar diffusion assays, the antifungal effect of the polyphenol mangiferin obtained from leaves of mango trees. The strongest antifungal activity was observed on *Thermoascus aurantiacus*, while more weakly

effect was observed on *S. cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *A. flavus* and *A. fumigatus*. However, no inhibition zones were found with regard to *Candida albicans*, *A. niger*, *F. moniliforme* and *F. oxysporum*. Singh et al. (2009) detect an antifungal effect of mangiferin and its analogues compounds against *C. albicans* (MTCC-183) and *A. niger* (MTCC-228). Kanwal et al. (2010) showed the antifungal properties of flavonoids isolated from mango leaves against pathogenic fungi (*Alt. alternata*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Macrophomina phaseolina* and *P. citrii*). Gupta et al. (2010) used three different extracts from mango leaves and peels against *C. albicans*. MICs were between 7.5-12.5 mg/mL and 7.5-17.5 mg/mL when mango leaves or peels extracts were used, respectively. Singh et al. (2010) showed the significant antifungal activities of air-dried and powdered stem bark of *M. indica* against *C. albicans* (MTCC-183) and *Cryptococcus (Cry) albidus* (MTCC-2661) with MICs of 0.08 and 0.31 mg/mL, respectively. El-Gied et al. (2012) tested de antifungal activities of the mango fruit seed extracts against *C. albicans* and *A. niger* clinical isolates, using disc diffusion method at different concentration. Both microorganisms were inhibited by the extracts.

Taking into consideration the foregoing, the aim of this study was to determine the antifungal activity of different types of mango byproducts against frequently occurring food spoilage and pathogenic yeasts. The mango byproducts were obtained from peel and seeds of three mango cultivars cultivated in Canary Islands (Keitt, Sensation and Gomera-3). Their antifungal activity was analyzed against 18 yeasts species. Furthermore, the relationship between antifungal and antioxidant activity was investigated by multivariate analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and plant material

Gallic acid was purchased from Sigma (Madrid, Spain). Ethanol and acetone were purchased from HPLC grade from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Deionised water of 18 M Ω cm resistivity, purified with a milli-Q system (Millipore, Bedford, USA) was used. All other reagents used were of analytical grade.

Three cultivars (Keitt, Sensation and Gomera-3) of mango (*Mangifera indica* L.) were obtained from fields located in Tenerife (Canary Islands, Spain). The fruits were harvested at physiological maturity stage (mature-green) and allowed to ripen (full-ripeness or consumption stage) at 18 °C and 80-90% relative humidity. The consumption stage of each mango cultivar was characterized by different parameters [colour, texture, total soluble solids (TSS), pH and titratable acidity] according to the methodology previously described (Dorta et al., 2011). After the characterization, the peel and the seed (shell of fibrous endocarp, testa and embryo) was manually separated (peel:mango ratio, $31 \pm 1\%$; seed:mango ratio, $4.2 \pm 2.1\%$), cut into small pieces (0.5 x 1 cm) and freeze-dried at -40 °C in vacuum (50 mPa) for five days. The dried mango peels and seeds were ground to a fine powder (particle size between 355-500 μm). The dried mango peel and seed powder was stored at -20 °C until the extractions were carried out.

2.2. Preparation of mango peel and seed extracts

The extraction was performed employing microwave-assisted extraction (ETHOS 1, Milestone SRL, Sorisole, Italy) at 500 W for 60 min. The extraction conditions had been previously optimised in terms of maximum extraction of polyphenol content and antioxidant capacity (Dorta et al., 2013a;b). Two types of extractions (A and B) from peel were done. These extracts were obtained with ethanol:water (1:1.v:v) at 75 °C and a weight-to-solvent volume of 1:50 (w:v) (extraction A) or 1:10 (w:v) (extraction B). The extraction of mango seeds was carried out with acetone:water (1:1, v:v) at 50 °C and a weight-to-solvent volume of 1:30 (w:v).

After each extraction, the solvent was separated by centrifugation (525 x rpm at 4 °C for 20 min) and the supernatant reserved. The pellets were re-extracted two times more and the supernatants were combined and stored at -80 °C until use.

The different extracts obtained were evaporated to eliminate the organic solvent in a vacuum Heto VR-1 evaporator (Allerod, Denmark) at 40 °C. Each extraction process was done at least in triplicate. Finally a total of nine byproducts

extracts were obtained; KPA (Keitt cultivar from Peel with extraction type A); KPB (Keitt cv. Peel, extraction B); SPA (Sensation cv. Peel, extraction A); SPB (Sensation cv. Peel, extraction B); GPA (Gomera-3 cv. Peel, extraction A); GPB (Gomera-3 cv. Peel, extraction B); KS (Keitt cv. Seed); SS (Sensation cv. Seed); GS (Gomera-3 cv. Seed).

2.3. *Bioactive compounds content*

All measurements were made on a Shimadzu UV-visible 160A double-beam spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a Hellma (Jamaica, USA) cell (path length 10^{-2} cm).

2.3.1. *Phenol total content*

Total phenolic compound content was estimated by mixing 200 μ l of deionised water, 50 μ l of the extracts diluted by a factor of 4-10 and 50 μ l of Folin-Ciocalteau reagent (González-Montelongo et al., 2010). After 6 min, 500 μ l of 7% sodium carbonate solution were added to the mixture, which was adjusted to 1.3 mL with deionised water and allowed to stand at room temperature for 60 min. Then, the absorbance was read at 765 nm on a spectrophotometer.

Gallic acid (ranging from 15 to 250 mg/l) in the different solvents evaluated was used in the calibration curves (r^2 0.885-0.992). Each byproduct were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per litre of mango peel or seed extract, also the values were expressed in g GAE per 100 g of mango peel or seed on a dry matter basis (DW) in order to calculate the efficiency of each type of extraction process and each cultivar.

2.3.2. *Proanthocyanidins content*

The determination of proanthocyanidins content (condensed tannins) was based on oxidative depolymerization of proanthocyanidins in butanol-HCl (95:5 v:v, solvent:extract ratio, 5:1) (FAO/IAEA, 2000). The presence of iron reagent (2% ferric ammonium sulfate in 2 N HCl) increases the reproducibility and sensitivity of the assay. The mixture was incubated at 97 °C for 60 min; the proanthocyanidin content

(g leucoanthocyanidin equivalents (LEs)/100 g DW) was measured at 550 nm. Condensed tannins expressed as g leucoanthocyanidin (Les)/100 g DW mango seed and calculated by the following formula (FAO/IAEA 2000).

$$\text{Proanthocyanidins (g/100 g)} = \left[\frac{(\text{Abs}_{550} \cdot 78 \cdot \text{dilution factor})}{\text{DW (\%)}} \right]$$

2.3.3. Tannins content

The tannins content were determined using the Folin–Ciocalteu method for total phenolic compounds (González-Montelongo et al., 2010) coupled with the use of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP, Sigma) (FAO/IAEA 2000). The tannins precipitate when PVPP was added to the extracts (PVPP:phenolic compounds ratio: 100:1 w:w) and the pH of the extract was adjusted at 3.0. The supernatant only contains compounds other than tannins; therefore, they were quantified by calculating the difference between total phenolic compounds and the phenols in the supernatant, and expressed as g GAEs/100g DW mango peel or seed.

2.4. Antioxidant activity mango peel and seed

The antioxidant activities of mango peel and seed extracts were evaluated by using different methods.

2.4.1. β -carotene bleaching method

The capacity to inhibit lipid peroxidation was determined by the β -carotene bleaching method, based on the capacity of antioxidants to decrease oxidative losses of β -carotene in a β -carotene/linoleic acid system (Miller, 1971; González-Montelongo et al., 2010). The temperature was increased (50 °C) to induce autoxidation and oxygenated deionised water, which was generated by bubbling air into water for 60 min was used. In these conditions, the β -carotene molecules lose their conjugated double bonds and the loss of orange colour intensity was measured at 470 nm after incubation for 210 min. The antioxidant activity was expressed as antioxidant activity coefficient (AAC). The repeatability standard deviation of the procedure was always < 10%.

2.4.2. DPPH[•] method

The capacity to scavenge the DPPH[•] radical was monitored according to a slightly modified version of the method used by Brand-Williams et al. (1995) at 515 nm after 15 min. Results were expressed as g of TE (trolox equivalent antioxidant capacity)/100 g DW mango seed (González-Montelongo et al., 2010).

2.5. Antifungal activity of mango peel and seed

2.5.1. Yeast strains and culture conditions

Antifungal activity was checked against 18 yeast species: *Candida bracarensis* (CECT 12000), *C. glabrata* (ATCC 36583), *C. nivariensis* (CBS 9983), *C. parapsilopsis* (ATCC 22019), *Dekkera anomala* (ATCC 58985), *D. bruxellensis* (ATCC 36234), *Hanseniaspora uvarum* (CECT 11105), *Lodderomyces elongisporus* (ATCC 11503), *Metschnikowia pulcherrima* (CECT 11602), *Pichia fermentans* (ATCC 10651), *P. kluyveri* (CECT 11023), *P. ohmeri* (ATCC 46053), *Schizosaccharomyces japonicus* (ATCC 10660), *Sacharomycodes ludwigii* (ATCC 11313), *Zygosaccharomyces bailii* (CECT 11997), *Z. bisporus* (ATCC 52405), *Z. microellipsoides* (ATCC 10605) and *Z. rouxii* (ATCC 2623). The yeasts were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA), the Spanish Type Culture Collection (CECT) (Valencia, Spain) or the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) (Utrecht, The Netherlands), and were maintained in 30% w/v glycerol at -80 °C until use. For experiments, all the yeast strains were grown separately on Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) agar [5 g/L yeast extract (Pronadisa); 3 g/L peptone (Cultimed, Panreac); 20 g/L dextrose (VWR BDH Prolabo)] at 28 °C for 24-48 h, to ensure optimal growth conditions and purity.

The antifungal activity of the mango peel and seed extracts was determined using two different bioassays: agar diffusion and micro-dilution.

2.5.2. Agar diffusion assay

Each yeast strains were grown at an optical density at wavelength 600 nm (OD₆₀₀) of 1, in YPD broth with agitation at 28 °C and mixed with melted warm YPD

1% agar medium at a final OD₆₀₀ of 0.033. 60 µL of each extracts were added to 8-mm-diameter wells dug in YPD 1% agar medium plates. After 2 h at 4 °C, plates were incubated at 28 °C for 24-48 h and then the inhibition zones (mm) were measured. All assays were performed in duplicate.

2.5.3. Micro-dilution antifungal assay

The extracts and yeast that have tested positive in the agar diffusion assay be used in the microdilution bioassay to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).

The extracts were re-suspended to a concentration of 0.1 to 30 mg GAE/mL with sterile milli-Q water. The MICs of the extracts were determined by a serial dilution method, in 96-well sterile microtitre plates. Each yeast strain was grown up to exponential phase (OD₆₀₀=0.5) in YPD broth with agitation at 28 °C. Cells suspensions were diluted in sterile YPD concentrate (3X) at OD₆₀₀ of 0.1, and then were mixed with the different extracts. Briefly, 44 µl of cells suspension (OD₆₀₀=0.1) and 66 µl of extract were added in each well. The final inoculum contained approximately 2×10^5 CFU/mL in a final volume of 110 µl/well. The microtitre plates were mixed and incubated under aerobic conditions at 28 °C for 24-48 h, and then examined by a binocular microscope and spectrophotometrically. A positive control (containing yeasts without extracts) and negative control (containing extracts without yeast) were included on each microplate. The MIC was determined as the lowest concentration of extracts inhibiting the visual growth of the yeast culture on the microplate. The spectrophotometrically were determined by using microdilution automatic reader at a wavelength of 600 nm and each test sample was considered negative when the yeast growth resulted in 90% inhibition compared with the positive control (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Additionally, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined via serial subcultivation of 10 µl aliquots of each well in microtitre plates containing 90 µl of fresh YPD broth per well and further incubation for 24-48 h at 28 °C. The lowest concentration with no visible growth (at the binocular microscope) and by

spectrophotometric analysis was defined as the MFC. Each sample was tested in triplicate in separate experiments.

2.6. Statistical analysis

The data are presented as mean values \pm standard deviation (SD) on three replicate experiments. The analysis of variance (ANOVA) was carried out using the statistical package Statistix 9.0 (Analytical software, 2008) and means were compared using the Tuckey test to determine their statistical significance. Factorial analyses of variance were used to test for differences between type extraction process (A and B) and cultivars. Any probability less than or equal to 0.05 was considered significant.

In addition principal component analysis (PCA) of the relationship between antimicrobial properties (halo inhibition zone), bioactive compounds and antioxidant activity was performed by using SPSS software (versions 19, SPSS Inc, IL, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Bioactive compound content

The results showed that all byproducts analyzed contained significant amounts of total phenols (8-18 g GAE/100 g DW). The 89-97% of total phenols was tannins. No significant difference between cultivars or extraction process was detected in total phenols (g GAE/100 g) from peel extracts. However, seed extracts from Sensation and Gomera-3 cultivars had higher phenols concentration than those of Keitt cultivar (Table 1).

Several authors reporter the effect of the mango cultivar, the type of by-product, the conditions of extractions and the extraction process, in the profile of bioactive compounds of the extracts and therefore on their antioxidant activities (Berardini et al., 2005; Soong and Barlow, 2006; Ribeiro et al., 2008; Khammuang and Sarnthima, 2011; Pitchaon, 2011). The amounts of total phenol extraction

reported in the literature are diverse. For example, Soong and Barlow (2004) analyzed mango seed kernel extracts in Singapore and reported 11.7 g GAE/100 g and 16.0 g GAE/100 g when heating at 160 °C. Abdalla et al. (2007) reported a total phenol content of mango seed Zebda, Balady and Succary cultivars of 0.11 g GAEs/100 g DW with around 21% of tannins. Khammuang and Sarnthima (2011) described values between 7.38 g GAE/100 g from mango Kaew cultivar and 39.98 g GAE/100 g from mang Chok-Anan cultivar in Thailand. Pitchaon (2011) detected significant difference in the total phenolic content of mango (cv. Chok-Anan) seed kernel extracts obtained by shaking (11.0 g GAE/100 g) or acid hydrolysis (28.57 g GAE/100 g). As it has been shown, these ranges of values shows the influence of the cultivar and the extraction process on the polyphenols yield. Also, these data could be showing the effect of the growing environment in which the mango was cultivated. In general, phenols values obtained in our conditions were relatively high compared with most of the references (Table 1).

The analysis of proanthocyanidins showed that extracts obtained from peel with the extraction process B (0.24-0.46 mg LEs/100 g DW) had higher content than in extraction A (0.08-0.18 mg LEs/100 g DW) (Table 1). These results confirm those obtained in previous work with Keitt cultivar (Dorta et al., 2013b). In the case of mango seed, the proanthocyanidins content was between 0.59-0.80 mg LEs/100 g DW and the Keitt cultivar shows the highest content (Table 1).

Actually, no studies about total content of proanthocyanidins in mango byproducts were reported, except the previous works in mango Keitt cultivar (Dorta et al., 2013a, b). Furthermore, it can be observed that the content of proanthocyanidins in mango Keitt, Sensation and Gomera-3 cultivars was lower than other byproducts. For example, González-Centeno et al. (2012) reported 79.1-202.3 mg proanthocyanidins/g DW from stem winemaking and Xu et al. (2006), 681-1760 mg proanthocyanidins/g DW from bramble seeds. Nevertheless, Keitt seed cultivar presented higher content in proanthocyanidins than seeds from two cultivars of avocado (Kosińska et al., 2012).

3.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity of mango peel and seed extracts was determined as free radical-scavenging ability (DPPH[•] method) and by the capacity to inhibit lipid peroxidation (β -carotene bleaching method). These results are summarized in Table 1.

The seed extract of Keitt cultivar showed the lowest ability to scavenging DPPH[•] radical. Moreover, no effect of cultivar and extraction process was observed in peel extracts.

The peel and mango seed showed higher scavenging capacity against DPPH[•] than banana peel (3.1 g of TE/100 g DW) (González-Montelongo et al., 2010) and Tommy Atkins mango peel cultivar (0.12 g of TE/100 g DW) (Berardini et al., 2005). Nevertheless, other extracts from residues of tropical fruits showed strongest scavenger activity against DPPH[•] as cajá-umbu (*Spondias* sp) (63 g TE/100 g DW) (Correia et al., 2012).

With regard to the AAC values, the extraction process and the cultivar had a significant effect (Table 1). The peel extracts A and the seed extracts from Keitt cultivar showed the lowest capacity to inhibit lipid peroxidation. Other byproducts, like banana peel (González-Montelongo et al., 2010)), showed higher AAC capacity to inhibit β -carotene bleaching than all cultivars of mango peel obtained by extraction process A (1.2-1.4 times). However, when the extraction process B was carried out, the mango peel from all cultivars showed around 1.2-1.3 times higher AAC than those described by González-Montelongo et al. (2010) for banana peel. Likewise the cultivar was important and in the case of mango seed, only the cultivar Sensation and Gomera-3 showed higher AAC than banana peel (1.2 times).

The AAC values from mango peel extracts (extraction B) and seed extracts (Sensation and Gomera-3 cultivars), were very similar to the synthetic antioxidants used in the food industry [653 and 559 for Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), respectively] (Barbosa-Pereira et al., 2013). Therefore, the mango peel and seed extracts were very effective in protecting β -carotene from oxidation and displayed similar effectiveness to BHA and greater

activity than BHT. Similar results were observed in the extracts obtained from a brewery waste stream (Barbosa-Pereira et al., 2013).

3.3. Antifungal activity

The antifungal activity of mango peel and seed extracts against nine yeast genera and 18 species associated with food spoilage or human pathogens were tested. A total of nine byproducts extracts (see Materials and Methods) were used with the following concentration: KPA (Keitt Peel, extraction A), 54 mg GAE/mL; KPB (Keitt Peel, extraction B), 230 mg GAE/mL; SPA (Sensation Peel, extraction A), 74 mg GAE/mL; SPB (Sensation Peel, extraction B), 264 mg GAE/mL; GPA (Gomera-3 Peel, extraction A), 72 mg GAE/mL; GPB (Gomera-3 Peel, extraction B), 262 mg GAE/mL; KS (Keitt Seed), 106 mg GAE/mL; SS (Sensation Seed), 190 mg GAE/mL; GS (Gomera-3 Seed), 196 mg GAE/mL.

The agar diffusion assay showed that all extracts (from peel and seed) have an inhibition effect in all the tested yeasts. The yeast species most sensitive to peel extracts were *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *L. elongisporus* (sorted from highest to lowest) and the most tolerant were *S. japonicus*, *D. anomala* and *Z. bailii*. The extraction process was the variable that most influence the inhibitory growth effect. Likewise, this result was related to the amounts of totals phenols as a result of the ratio weight-to-solvent volume used in each extraction process (see Materials and Methods). Extracts obtained with process A had lower amount of phenols than those obtained with process B (66 mg GAE/mL and 252 mg GAE/mL, respectively). Furthermore, the cultivar has less influence in the antifungal activity and in most cases no interaction (extraction process x cultivar) was detected (Table 2). Cultivar influence was observed in *C. glabrata*, *H. uvarum* and *S. japonicus* and interaction effect was observed in *C. nivariensis*, *P. ohmeri*, *Z. bailii* and *Z. microellipsoides* species.

The 66% of the yeast species showed no significant differences in the antifungal activity by cultivar when seed extract was used. On the other hand, extracts obtained from cultivars Sensation and Gomera-3 have higher antifungal activity than extracts of cultivar Keitt against *D. anomala*, *H. uvarum*, *P. fermentans*, *P.*

kluveri and *Z. microellipsoides*. Like it happened with the extracts obtained from peel, the yeast species that showed high sensitivity to seed extracts were *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *L. elongisporus* and the most tolerant were *S. japonicas*, *D. anomala* and *C. braccarensis* (Table 3).

In general, the MICs values for seed extracts were lower than for peel extracts. *P. ohmeri*, *Z. bisporus* and *H. uvarum* were the species more sensitive and *D. bruxellensis*, *L. elongisporus* and *S. ludwigii* the more resistant when the peel extracts were used (Table 4). Likewise, unlike what was observed in the agar diffusion tests, in most of the yeast species, no significant differences between treatments (cultivars and extraction processes) were observed. These results were probably due to the fact that in these assays (micro-dilutions) all extracts were resuspended at the same concentration of mg GAE/mL.

Similarly as was observed in the agar diffusion assays, in some yeast species the seed extracts from Sensation and Gomera-3 showed more antifungal activity (lowest MICs values) than those of the Keitt cultivar. *P. ohmeri*, *Z. bisporus* and *M. pulcherrima* were the species more sensitive to mango seed extracts, and *L. elongisporus* was the most resistant.

No significant correlation was observed between antifungal activity analyzed by both bio-assays methods (agar diffusion and micro-dilution) (data not shown). Unlike in any case the results were contradictory. This is the case of the species *L. elongisporus*, where the susceptibility to peel and seed extracts in the agar diffusion assay was high, whereas in the micro-dilution assay was one of the species with higher MICs values. Also, there were no coincidences in the susceptibility or resistance of the species between methods. In other words, the more susceptible or resistant species in the agar diffusion assays were not the same as those observed in the micro-dilution test. This contradiction is difficult to explain, however, these results would suggest that the sensitivity level of the yeasts species to extracts were conditioned by the culture conditions.

The MFC was performed to confirm cell death in MICs test. Under the tested concentrations, most of the yeast species showed a significant difference between the MICs and MFCs values, which would indicate that mango extracts have a

fungistatic effect (Table 4). However, tests should be made at higher extract concentrations to determine definitively if the effect of these extracts against yeast is only fungistatic. In addition it would be advisable to perform the MFCs test transferring an aliquot of the MICs wells to a Petri plate with culture medium. In this way, the direct effect of the extracts on the yeasts cells would be eliminated, by dilution, when performed the MFC test.

Some of the yeast species analyzed in this work that showed high sensitivity to mango extracts, are the causal agent of invasive mycoses in severely immunocompromised patients. *C. glabrata* is often the second most common cause of candidiasis after *C. albicans* and the major cause of candidemia among diabetic patient (Fidel et al., 1999; Bader et al., 2004). The presence of this yeast is a major problem because decrease the susceptibility to fluconazole (Nucci and Marr, 2005). Furthermore, in Latin American countries and in some parts of the world, *C. parapsilosis* is more problematic than *C. glabrata* (Colombo et al., 1999). *C. parapsilosis* has been isolated from a wide variety of foods as well (Pitt and Hocking, 2009). *C. nivariensis* exhibit multidrug resistance to azole antifungal agents and have MICs similar to or even more elevated than those for *C. glabrata* (Borman et al., 2008). *C. bracarensis* were isolated from patients suffering from candidiasis (Correia et al., 2006). Moreover, other yeasts used in this study produce food spoilage in different stages throughout the production chain, principally related with spoilage of beverages (Stratford, 2006; Fleet, 2011).

Natural antimicrobial compounds from plants are usually called green chemicals for food preservation and many herbs and spices are often known to be food grade or even GRAS (Generally Recognised As Safe) (Rahman, 1999). Different types of plants have been recognized for many years for their antimicrobial properties in foods (condiments or flavourings) and the antimicrobial and anti-inflammatory effects in the traditional medicine. However, there are few data regarding the antifungal, especially "antiyeast", properties of mango byproducts. According to our knowledge, a few number of yeast species were tested against mango byproducts. *C. albicans* is the most studied yeast specie and together with *Cry. albidus* are the only two species in which the MIC value was determined.

Stoilova et al. (2005) observed a weakly antifungal effect in agar diffusion assays against *S. cerevisiae*, when using polyphenol mangiferin obtained from leaves of mango trees. Nevertheless no inhibition zones were found with regard to *C. albicans*. Singh et al. (2009) detect an antifungal effect of mangiferin and its analogues compounds against *C. albicans* (MTCC-183). Singh et al. (2010) showed the significant antifungal activities of air-dried and powdered stem bark of *M. indica* against *C. albicans* (MTCC-183) and *Cry. albidus* (MTCC-2661) with MICs of 0.08 and 0.31 mg/mL, respectively. Gupta et al. (2010) tested mango leaves and rind extracts against *C. albicans* and report MICs between 7.5-12.5 mg/mL and 7.5-17.5 mg/mL from leaves and rind extracts, respectively. El-Gied et al. (2012) showed de antifungal activities of the mango fruit seed extracts against *C. albicans* clinical isolates, using disc diffusion method at different concentration. In most referenced work [except Singh et al. (2010)] the antifungal analysis were performed by disc agar diffusion assays. In the present work we analyzed the antifungal activity by two methods: agar diffusion and microdilution. The MICs values for peel and seed extracts were between 0.1-5 mg GAE/mL. These values were similar than those obtained using others extracts from different vegetal species. For example, extracts from peanut (*Arachis hypogaea* L.) skins obtained by multisolvent procedure was tested against *Z. bailii* and *Z. bisporus* and showed an inhibitory action at 1 mg/mL and 10 mg/mL (Sarnoski et al., 2012). Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract (Edor cultivar) exhibited an antifungal activity similar to Sensation and Gomera-3 seed extract against *C. parapsilosis* (MIC: 0.5 mg GAE/mL). Nevertheless, concentrations upper to 16 mg/mL of Longan pulp extract were ineffective against the same yeast species (Rangkadilok et al., 2012).

3.4. Principal component analysis (PCA)

PCA was conducted in order to reduce the dimensionality of the data and to visualize the variables from a two dimensional point of view. PCA was applied on the whole data analysed (extracts from mango peel and seed) with the objective to establish a relationship between mango cultivar, type byproducts, antioxidant activity, antifungal activity (inhibition zone), total bioactive compounds quantified

and compounds identified (data not shown). The analysis of PCA generated two principal components, PC1 and PC2, with a cumulative explained variance of 62.9% of the total variance in byproducts extracts samples. Figure 1a shows the plot of loadings by selecting the two principal components as axes. PC1 component (cumulative explained variance 37.5%) was correlated with DPPH[•] and strongly related with flavonoids, benzophenones and ellagic acid, accordingly, the PC1 component was correlated with scavenging radicals capacity and therefore the compounds mentioned are related with this capacity. Furthermore, PC2 (cumulative explained variance 25.4%) was correlated with diameter of inhibition zone (HALO), capacity to inhibition lipid peroxidation, total phenols content, tannins content, proanthocyanidins content and strongly related with gallates, gallotannins and mangiferin (Figure 1a). As a result, the new variable PC2 was clearly associated with the antifungal capacity of the extracts and with the high capacity to inhibition lipid peroxidation, therefore we could point out that the extracts with high values of AAC have antifungal properties.

The Figure 1b shows the corresponding scores onto the two first principal components. As can be seen, samples are grouped in three distinct groups: Group 1: KPA (Keitt cv. Peel, extraction A), SPA (Sensation cv. Peel, extraction A), GPA (Gomera-3 cv. Peel, extraction A), KS (Keitt cv. Seed), GS (Gomera-3 cv. Seed); Group 2: GPB (Gomera-3 cv. Peel, extraction B) and Group 3: SS (Sensation cv. Seed), KPB (Keitt cv. Peel, extraction B), SPB (Sensation cv. Peel, extraction B).

The Group 1 corresponded to the peel extracts from all mango cultivars obtained using extraction process A and the seed extracts of Keitt and Gomera-3 cultivars, had low score in PC2 which has been related with a low antifungal capacity.

The Group 2 had a unique component (GPB). This group was characterized for their high scavenging capacity and a moderate antifungal capacity.

Finally the Group 3, consisted of the extracts obtained using extraction process B (KPB and SPB) and from seed Sensation cultivar (SS). This group presented high PC2 score characterized by a high content in proanthocyanidins and high capacity to inhibit lipid peroxidation, as well as high antifungal activity.

The results showed that the extracts with high antioxidant activity and high content in phenolic compounds (SPB, GPB, SS and GS) showed strong antifungal activity. Therefore, we can outline a possible relationship between antioxidant activity and antifungal activity

The biological activities of large number of plants, fruit and byproducts extracts have been attributed different phytochemicals compounds. Several works confirm that the antifungal capacity of natural extracts was related with their tannins content (proanthocyanidins or condensed tannins and hydrolysable tannins) (Patel et al., 2011, Yamaguchi et al., 2011, Sarnoski et al., 2012). Extracts rich in proanthocyanidin from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) inhibit the growth of *Candida* spp. and *Cry. neoformans* (Patel et al., 2011). Similar results were found in extracts from peanut skins against *Z. bailii* and *Z. bisporus* (Sarnoski et al 2012) and hydroalcoholic extract of *Ocotea odorifera* leaves against *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Yamaguchi et al., 2011). Yamaguchi et al. (2011) confirmed by scanning electron microscopy the presence of damage to the yeast cell after treatment with ellagitannin isolated from the leaves of *O. odorifera*. The actions of the proanthocyanidins are similar to hydrolysable tannins and have been previously described by Sarnoski et al. (2012) and Patel et al. (2011). However, another explanation for yeast inhibition due to proanthocyanidins is the iron deprivation. Metal ions like iron, copper, and zinc ions have important functions in yeast physiology, and they may all be chelated by tannic acid (Wauters et al., 2001).

Therefore, in the case of mango extracts the proanthocyanidins could be responsible for the antifungal activity, and the principals compounds related with antifungal properties are ellagitannins or gallotannins (Figure 1a). Previous works with gallotannins isolated from mango seed described the iron binding capacity as the mode of antimicrobial action of these compounds (Engels et al., 2009; 2010; 2011).

4. Conclusions

Mango peel and seed extracts from different cultivars obtained in Tenerife (Canary Islands) showed good antioxidant activity and antifungal effect against 18

yeast species associated with food spoilage or human pathogens. The antifungal and/or antioxidant properties have been significantly affected by the extraction process and the cultivar. Multivariate analysis allowed observing that the extract with high content in proanthocyanidins and high capacity to inhibit lipid peroxidation showed high antifungal activities. Therefore, the present study strongly suggested the potential applications of mango seed and peel extract (waste of mango fruit production) or its polyphenolic compounds as an antifungal agent. Furthermore, the active compounds could be of interest in the pharmaceutical and food industry.

Acknowledgements

The Spanish “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria” (INIA) awarded E. Dorta a PhD INIA grant. This research was supported through the RTA2006-00187 project, also financed by the INIA. F. Laich is supported by the “Recursos y Tecnologías Agrarias in coordination with the Comunidades Autónomas del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2004–2007” program, financed with the involvement of the European Social Fund.

References

- Abdalla, A.E.M., Darwish, S.M., Ayad, E.H.E., El-Hamahmy, R.M., 2007. Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry* 103, 1134-1140.
- Abdullah, A., Saeed Mirghani, M., Jamal, P., 2011. Antibacterial activity of Malaysian mango kernel. *African Journal of Biotechnology* 10, 18739-18748.
- Analytical software, 2008. Statistix 9, Tallahassee FL. USA.
- Bader, M.S., Lai, S.M., Kumar, V., Hinthorn, D., 2004. Candidemia in patients with diabetes mellitus: epidemiology and predictors of mortality. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 36, 860-864.

- Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., Cruz, J.M., 2013. Phenolic profile and antioxidant properties of a crude extract obtained from a brewery waste stream. *Food Research International* 51, 663–669.
- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., Schieber, A., 2005. Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1563-1570.
- Borman, A.M, Petch, R, Linton, C.J, Palmer, M.D, Bridge, P.D, Johnson EM., 2008. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 933-938.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28, 25-30.
- Cojocar, M., Droby, S., Glotter, E., Goldman, A., Gottlier, H.E., Jacoby, B., Prusky D., 1986. 5-(12-Heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry* 25, 1093-1095.
- Colombo, A.L., Nucci, M., Salomão, R., Branchini, M.L., Richtmann, R., Derossi, A., Wey, S.B., 1999. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 34, 281-286.
- Correia, A., Sampaio, P., James, S., Pais, C., 2006. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 313–317.
- Correia, R.T.P., Borges, K.C., Medeiros, M.F., Genovese, M.I., 2012. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International* 18, 539–547.
- Dorta, E., Lobo, M.G., González, M., 2011. Reutilization of mango by-products: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science* 77, C80-C88.
- Dorta, E., Lobo, M.G., González, M., 2013a. Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from mango seed. *Food and Bioprocess Technology* 6, 1067-1081.

- Dorta, E., Lobo, M.G., González, M., 2013b. Improving the efficiency of antioxidant extraction from mango peel by using microwave-assisted extraction. *Plants Food for Human Nutrition*. doi 10.1007/s11130-013-0350-4.
- Droby, S., Prusky, D., Jacoby, B., Goldman, A., 1986. Presence of antifungal compounds in the peel of mango fruits and their relation to latent infections of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29, 173–183.
- El-Gied, A., Joseph, M., Mahmoud, I., Abdelkareem, A., Al Hakami, A., Hamid, M., 2012. Antimicrobial activities of seed extracts of mango (*Mangifera indica* L.). *Advance in Microbiology* 2, 571-576.
- Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y.Y., Carle, R., Gänzle, M.G., Schieber, A., 2009. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 57, 7712-7718.
- Engels, C., Gänzle, M.G., Schieber, A., 2010. Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high-speed counter-current chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 58, 775-780.
- Engels, C., Schieber, A., Gänzle, M.G., 2011. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2215-2222.
- FAO/IAEA., 2000. Quantification of tannins in tree foliage. Vienna: Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.
- Fleet, G.H., 2011. Yeast spoilage of foods and beverages. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Vol. 1, 5th edn, Elsevier, New York, pp. 53-63.
- Fidel, P., Vazquez J., Sobel, J., 1999. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 80-96.
- González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.L., 2012. Proanthocyanidin composition and antioxidant potencial of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11850-11858.

- González-Montelongo, R., Lobo, M.G., González, M., 2010. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology* 71, 347-355.
- Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, L., Vaughan-Martini, A., and Buzzini, P., 2009. In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 131, 178-182.
- Gupta, P., Deshmukh, P., Ravishanker., 2010. Antimicrobial and phytochemical screening of *Mangifera indica* against skin ailments. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 4, 387-392.
- Jamboonsri P, Pithayanukul P, Bavovada R, Chomnawang M.T., 2011. The inhibitory potential of Thai mango seed kernel extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 16, 6255-6270.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., Dosako, S., 2000. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry* 71, 61-66.
- Kanwal, Q., Hussain, I., Siddiqui, H.L., Javaid, A., 2010. Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Natural Product Research* 24, 1907-1914.
- Khammuang S, Sarnthima R., 2011. Antioxidant and antibacterial activities of selected varieties of thai mango seed extract. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science* 24, 37-42.
- Kim, H., Moon, J.Y., Kim, H., Lee, D.S., Cho, M., Choi, H.K., Kim, Y.S., Mosaddik, A., Cho, S.K., 2010. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry* 121, 429-436.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., Dykes, G.A., 2012. Phenolic compounds profiles and antioxidant capacity of Persea Americana Mill. peels and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 4613-4619.

- Loureiro, V., 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International* 33, 247-256.
- Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 48, 91.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts: approved standard, 2nd ed. Document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Negi, P.S., Saby John, K., Prasada Rao, U.J.S., 2002. Antimicrobial activity of mango sap. *European Food Research and Technology* 214, 327-330.
- Nucci, M., Marr, K.A., 2005. Emerging fungal diseases. *Clinical Infectious Diseases* 41, 521–526.
- Patel, K.D., Scarano, F.J., Kondo, M., Hurta, R.A.R., Neto, C.C., 2011. Proanthocyanidin-rich extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) selectively inhibit the growth of human pathogenic fungi *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12864-12873.
- Pitchaon, M., 2011. Antioxidant capacity of extracts and fractions from mango (*Mangifera indica* Linn.) seed kernels. *International Food Research Journal*. 18, 523-528.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and food spoilage*, third ed. Springer, New York.
- Rahman, M.S., 1999. *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Raman, N., Nagendran, S., Sundaramahalingam, A., 1997. Extraction, characterisation and antimicrobial activities of mango seed oil. *Asian Journal of Chemistry* 9, 321-323.
- Rajan, S., Thirunalasundari, T., Jeeva, S., 2011. Anti-enteric bacterial activity and phytochemical analysis of the seed kernel extract of *Mangifera indica* Linnaeus against *Shigella dysenteriae* (Shiga, corrig.) Castellani and Chalmers. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4, 294-300.

- Rangkadilok, N., Tongchusak, S., Boonhok, R., Chaiyaroj, S.C., Junyaprasert, V.B., Buajeeb, W., Akanimanee, J., Raksasuk, T., Suddhasthira, T., Satayavivad, J., 2012. In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia* 83, 545-553.
- Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knödler, M., Schieber, A., 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* 110, 620-626.
- Sarnoski, P.J., Boyer, R.R., O'Keefe, S.F., 2012. Application of proanthocyanidins from peanut skins as a natural yeast inhibitory agent. *Journal of Food Science* 77, M242-M249
- Shah, K.A., Patel, M.B., Patel, R.J., Parmar, P.K., 2010. *Mangifera indica* (Mango). *Pharmacognosy Review* 4, 42-48.
- Singh, S.K., Kumar, Y., Sadish Kumar, S., Sharma, V.K., Dua, K., Samad, A., 2009. Antimicrobial evaluation of mangiferin analogues. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71, 328-331.
- Singh, M., Khatoon, S., Singh, S., Kumar, V., Singh Rawat, A., Mehrotra S., 2010. Antimicrobial screening of ethnobotanically important stem bark of medicinal plants. *Pharmacognosy Research* 2, 254-257.
- Soong, Y.Y., Barlow, P.J., 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* 88, 411-417.
- Soong, Y.Y., Barlow, P.J., 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, 524-530.
- Souto de Oliveira, S.M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Junior, J.P., De Carvalho Costa, M.J., De Melo Diniz, M.F.F., 2011. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extract of mango (*Mangifera indica*) peel. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 190-193.
- Stoilova, I., Gargova, S., Stoyanova, A., Ho, L., 2005. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin *Herba Polonica* 51, 37-44.

- Stratford, M., 2006. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *The Yeast Handbook. Yeasts in Food and Beverages*. Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin. pp 335-379.
- Vaghasiya, Y., Patel, H., Chanda, S., 2011. Antibacterial activity of *Mangifera indica* L. seeds against some human pathogenic bacterial strains. *African Journal of Biotechnology* 10, 15788-15794.
- Wauters, T., Iserentant, D., Verachtert, H., 2001. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to tannic acid is due to iron deprivation. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 290-293.
- Xu, Y., Zhang, Y., Chen, M., Tu, P., 2006. Fatty acids, tocopherols and proanthocyanidins in bramble seeds. *Food Chemistry* 99, 586-590.
- Yamaguchi, M.U., Garcia, F.P., Cortez, D.A.G., Nakamura, T.U., 2011. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 507–514.

Figuras y Tablas

Cultivar	Total phenols (g GAE/100 g) ¹		Proanthocyanidins (mg LEs/100 g) ²		DPPH [•] (g TE/100 g) ³		Inhibition of β -carotene bleaching (AAC) ⁴	
	Extraction process		Extraction process		Extraction process		Extraction process	
Peel	A	B	A	B	A	B	A	B
Keitt	13 ± 3 ^{a/A}	11 ± 1 ^{a/A}	0.081 ± 0.006 ^{b/B}	0.241 ± 0.013 ^{a/B}	43 ± 3 ^{a/A}	47 ± 1 ^{a/A}	361 ± 8 ^{b/C}	587 ± 10 ^{a/B}
Sensation	18 ± 1 ^{a/A}	13 ± 3 ^{a/A}	0.159 ± 0.013 ^{b/A}	0.480 ± 0.042 ^{a/A}	43 ± 8 ^{a/A}	47 ± 2 ^{a/A}	443 ± 12 ^{b/A}	632 ± 28 ^{a/A}
Gomera-3	16 ± 1 ^{a/A}	13 ± 1 ^{a/A}	0.179 ± 0.009 ^{b/A}	0.459 ± 0.045 ^{a/A}	41 ± 8 ^{a/A}	41 ± 9 ^{a/A}	398 ± 6 ^{b/B}	555 ± 24 ^{a/B}
Seed								
Keitt	8 ± 0.1 ^B		0.80 ± 0.09 ^A		22 ± 3 ^B		469 ± 6 ^B	
Sensation	15 ± 1.2 ^A		0.60 ± 0.06 ^B		38 ± 4 ^A		575 ± 5 ^A	
Gomera-3	15 ± 0.7 ^A		0.59 ± 0.04 ^B		44 ± 5 ^A		589 ± 5 ^A	

Table 1. Bioactive compounds and antioxidants activity of mango seed and peel extracts.

Values are the mean ± standard deviation of the least three determinations. Different lower or upper case letters denote significant differences ($P < 0.05$) between extraction process (a-c) or between cultivars (A-C) used to obtain the extracts from peel and seed. ¹ Expressed as g of gallic acid equivalents (GAEs)/100 g DW plant material; ² Expressed as g leucoanthocyanidin (Les)/100 g DW plant material; ³ TE. Trolox equivalent capacity; ⁴ AAC, antioxidant activity coefficient.

Yeast species	Inhibition zone diameter (mm) ^a						P value		
	Extraction process (E)		Cultivars (C)						
	A	B	Gomera-3	Sensation	Keitt	E	C	ExC	
<i>Candida bracarensis</i> CECT 12000	7.5 a	7.5 a	7.8 a	7.8 a	6.3 a	0.4433	0.1551	0.4558	
<i>Candida glabrata</i> ATCC 36583	8.7 b	12.0 a	10.0 ab	11.7 a	9.2 b	0.0007	0.0148	0.2569	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	9.7 b	13.3 a	12.0 a	11.2 a	11.2 a	0.0000	0.0525	0.5724	
<i>Dekkera anomala</i> ATCC 58985	5.2 b	8.7 a	7.3 a	7.3 a	6.3 a	0.0042	0.4640	1.0000	
<i>Dekkera bruxellensis</i> ATCC 36234	6.0 b	9.5 a	8.5 a	7.8 a	7.0 a	0.0003	0.0722	0.6249	
<i>Hanseniaspora uvarum</i> CECT 11105	6.5 b	12.3 a	10 a	10.3 a	8.0 b	0.0000	0.0112	0.0816	
<i>Lodderomyces elongisporus</i> ATCC 11503	7.7 b	12.8 a	10.8 a	10 a	10 a	0.0000	0.1644	0.2227	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CECT 11202	6.0 b	12.0 a	9.0 a	9.7a	8.3 a	0.0002	0.2319	0.3005	
<i>Pichia fermentans</i> ATCC 10651	6.7 b	10.2 a	8.8 a	8.3 a	8.3 a	0.0007	0.6404	0.3160	
<i>Pichia kluyveri</i> CECT 11023	6.8 b	10.7 a	9.0 a	8.8 a	8.5 a	0.0005	0.7107	0.8877	
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ATCC 11313	8.5 b	11.3 a	9.5 a	10 a	10.3 a	0.0277	0.8034	0.6755	
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> ATCC 10660	3.2 b	4.8 a	4.0 ab	3.5 b	4.5 a	0.0005	0.0313	0.1768	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> ATCC 52405	7.3 b	11.2 a	9.5 a	9.3 a	9.0 a	0.0006	0.7313	0.5080	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ATCC 2623	6.7 b	10.3 a	9.5 a	8.3 a	7.8 a	0.0009	0.0896	0.9030	
	Extraction process x Cultivar (mm-inhibition diameter) ^a						P value (ExC)		
	Extraction process A			Extraction process B					
	Gomera-3	Sensation	Keitt	Gomera-3	Sensation	Keitt			
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	7.5 c	7.5 c	7.5 c	10.5 b	12.0 a	11.5 ab	0.0355		
<i>Pichia ohmeri</i> ATCC 46053	4.5 c	5.0 c	5.0 c	10.5 ab	11.5 a	8.5 b	0.0411		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> CECT 11997	5.5 cd	5.0 d	4.5 d	9.0 ab	11.0 a	7.5 bc	0.0215		
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i> ATCC 10605	7.0 b	5.5 bc	4.5 c	11.0 a	11.5 a	11.0 a	0.0446		

Table 2. Analysis of variance of the antifungal activity of mango peel extracts as determined by agar diffusion assay. ^a data shown the mm of clear zone of test, subtracted from a negative control. Different letters indicate that there are statistically significant differences between different extraction process, cultivars or extraction process x cultivar for each yeast specie (Tuckey, $P < 0.05$)

Yeast species	Inhibition zone diameter (mm) ^a			P value
	Gomera-3	Sensation	Keitt	
<i>Candida bracarensis</i> CECT 12000	6.5 a	6.0 a	6.0 a	0.9761
<i>Candida glabrata</i> ATCC 36583	9.0 a	8.5 a	7.5 a	0.0860
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	11.5 ab	14.0 a	11.0 b	0.0099
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	12.0 a	12.5 a	11.5 a	0.3536
<i>Dekkera anomala</i> ATCC 58985	6.5 a	7.0 a	5.0 b	0.0333
<i>Dekkera bruxellensis</i> ATCC 36234	8.5 a	10.5 a	9.0 a	0.3921
<i>Hanseniaspora uvarum</i> CECT 11105	11.5 a	12.5 a	8.0 b	0.0408
<i>Lodderomyces elongisporus</i> ATCC 11503	12.0 a	11.5 a	10.0 a	0.2213
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CECT 11202	9.0 a	9.5 a	7.5 a	0.0812
<i>Pichia fermentans</i> ATCC 10651	10.0 a	10.0 a	6.5 b	0.0051
<i>Pichia kluyveri</i> CECT 11023	10.0 a	9.0 a	7.5 b	0.0198
<i>Pichia ohmeri</i> ATCC 46053	8.0 a	7.5 a	6.0 a	0.2213
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ATCC 11313	10.0 a	11.0 a	10.0 a	0.4648
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> ATCC 10660	5.5 a	6.0 a	4.5 a	0.4219
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> CECT 11997	7.0 a	7.0 a	5.5 a	0.0540
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> ATCC 52405	4.5 b	10.5 a	4.0 b	0.0126
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i> ATCC 10605	13.0 a	12.0 a	8.0 b	0.0442
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ATCC 2623	7.5 a	9.0 a	7.5 a	0.1250

Table 3. Analysis of variance of the antifungal activity of mango seed extracts as determined by agar diffusion assay.

^a data shown the mm of clear zone of test, subtracted from a negative control. Different letters indicate that there are statistically significant differences between cultivars for each yeast specie (Tuckey, $P < 0.05$).

Yeast species	Antifungal activity of mango byproducts extracts (mg GAE/mL)									
		Peel extracts						Seed extracts		
		GA	SA	KA	GB	SB	KB	G	S	K
<i>Candida bracarensis</i>	MIC	1	1	0.5	1	1	1	0.5	0.5	1
CECT 12000	MFC	10	5	5	10	5	5	5	5	5
<i>Candida glabrata</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	1
ATCC 36583	MFC	10	10	10	10	10	10	5	5	>30
<i>Candida nivariensis</i>	MIC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5	0.1	0.1	0.5
CBS 9983	MFC	10	10	10	10	10	10	5	5	10
<i>Candida parapsilosis</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	5
ATCC 22019	MFC	10	10	5	10	5	5	>30	>30	>30
<i>Dekkera anomala</i>	MIC	1	0.5	1	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5
ATCC 58985	MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Dekkera bruxellensis</i>	MIC	5	5	5	5	5	5	0.5	0.5	5
ATCC 36234	MFC	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MIC	0.5	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	0.1
CECT 11105	MFC	15	10	10	10	10	10	5	5	10
<i>Lodderomyces longisporus</i>	MIC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
ATCC 11503	MFC	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MIC	0.1	0.5	<0.1	<0.1	0.5	0.5	<0.1	<0.1	<0.1
	MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Pichia fermentans</i>	MIC	5	5	1	5	1	1	1	1	5
ATCC 10651	MFC	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Pichia kluyveri</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1
CECT 11023	MFC	10	10	5	10	5	5	10	10	15
<i>Pichia ohmeri</i>	MIC	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ATCC 46053	MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	MIC	5	5	5	5	5	5	1	0.5	0.5
ATCC 11313	MFC	10	10	5	10	10	10	10	10	10
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	MIC	0.5	<0.1	1	<0.1	0.5	1	<0.1	<0.1	<0.1
	MFC	10	10	10	10	10	10	5	5	5
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5
CECT 11997	MFC	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	MIC	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1
	MFC	10	10	10	10	10	10	5	5	10
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	MIC	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5
	MFC	5	10	5	10	10	5	5	5	10
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	MIC	1	1	5	1	1	5	1	1	5
ATCC 2623	MFC	10	10	10	10	10	10	15	15	15

Table 4. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum fungicidal concentrations (MFC) of mango seed and peel extracts against different yeast species.

G, Gomera-3 cv.; S, Sensation cv.; K, Keitt cv.; A, extraction process A; B, extraction process B.

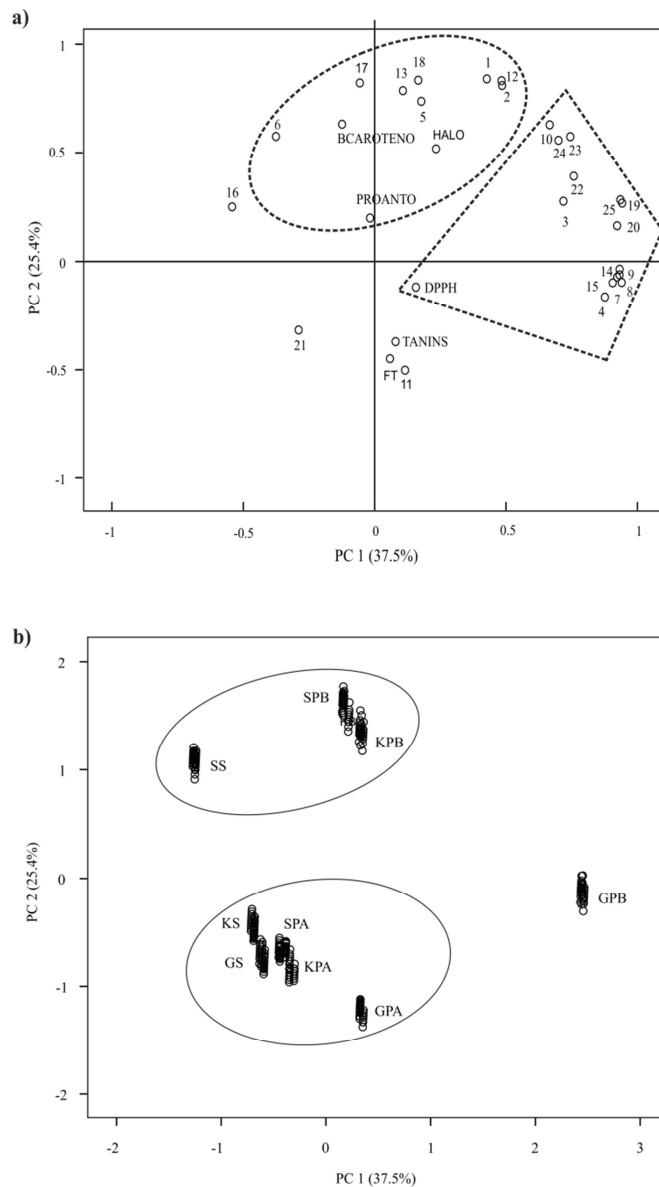


Figure 1. Factor loading plots resulting of principal component analysis (a) and score plot of the principal components and distribution of samples of mango peel and seed (b).

The numbers in figure a correspond with polyphenol identified mango byproducts; 1, galloyl glucose; 2, gallic acid; 3, theogallin; 4, maclurin 3-C- β -D-glucoside; 5, Di-galloyl-glucose; 6, methyl gallate; 7, maclurin 3-C(2-O-galloyl) β -D-glucoside; 8, Irioflophenone 3-C(2-O-galloyl) β -D-glucoside; 9, maclurin 3-C(2,3-di-O-galloyl) β -D-glucoside; 10, ethyl gallate; 11, mangiferin; 12, methyl gallate ester; 13, tetra-O-galloyl-glucoside; 14, quercetin 3-O-diglycoside; 15, Isoquercitrin; 16, ellagic acid; 17, valloneic acid dilactone; 18, penta-O-galloyl-glucoside; 19, quercetin pentoside; 20, quercitrin; 21, quercetin 3-O-rutinoside; 22, rahmnetin derivative; 23, ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate; 24, ethyl p-trigallate; 25, rahmnetin hexoside.

Mango byproducts extracts: GPA (Gomera-3 cv. Peel, extraction A); SPA (Sensation cv. Peel, extraction A); KPA (Keitt cv. Peel, extraction A); GPB (Gomera-3 cv. Peel, extraction B); SPB (Sensation cv. Peel, extraction B); KPB (Keitt cv. Peel, extraction B)

Screening of phenolic compounds in mangoes (*Mangifera indica* L.) cultivated in Spain by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis

Dorta, E.^a, González, M.^b, Lobo, M. G.^a, Sánchez-Moreno, C.^c & de Ancos, Begoña^c

^a*Post-harvest and Food Technology Laboratory, Department of Tropical Fruit Crops, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo. 60, 38200 La Laguna, Spain*

^b*Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, Spanish National Research Council (CSIC), 28006 Madrid, Spain*

^c*Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Spanish National Research Council (ICTAN-CSIC), 28040 Madrid, Spain*

Abstract

In this work, the peel and seed extracts of mango varieties, Keitt, Sensation and Gomera 3, obtained by different extraction systems, were analysed using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS) with negative ion detection. The compounds were confirmed by accurate mass measurements in MS and MS/MS mode. The elemental composition was selected according to the accurate masses and isotopic pattern. Thus 30 compounds were identified that belong to five phenolic families: Gallates and gallotannins; flavonoids mainly quercetin derivatives; ellagic acid and derivatives; xanthones principally mangiferin; benzophenones and derivatives such as maclurin derivatives. The contribution of each of these groups depends on the mango variety, the part of fruit studied (peels and seeds) and the extraction system used. In general, the two major predominant compounds in the peel were ethyl gallate and ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5)-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate. Methyl gallate and penta-O-galloyl-glucoside were the main compounds in the seeds. The PCA results permitted to determine which phenolic compounds differentiate the mango extracts studied. Cluster analysis (CA) revealed that mango by-products can be classified into three groups according to the polyphenols identified, showing that the extraction method has greater influence on the phenolic profile than the variety and the part of the fruit studied.

Keywords: *Mangifera indica* L.; Mango; Food ingredient; Gallotannins; Benzophenones; Xanthones; Flavonoids; High-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight- mass spectrometry; HPLC-ESI-QTOF-MS; Principal component analysis

1. Introduction

Tropical exotic fruit production, trade and consumption have increased significantly due to their attractive sensory properties and a growing recognition of their nutritional and health promoting properties (Ayala-Zabala et al., 2011). Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most popular edible fruits and its production, at present, ranks fourth in world fruit production, just after grapes, apples and bananas. Mango is cultivated in more than 100 countries in both tropical and subtropical regions, especially in Asia (FAOSTAT, 2011). Previous studies that focused on the chemical composition of mango fruits, mainly Indian and Brazilian varieties, have revealed that they have high content in bioactive compounds, such as carotenoid and phenolic compounds. The daily intake in the diet of these bioactive compounds have been shown to have possible health benefits due to their antioxidative, anticarcinogenic, antiatherosclerotic, antimutagenic, and angiogenesis inhibitory properties (Berardini et al., 2005; Masibo and He, 2008).

Mango is generally consumed as a dessert fruit, but there has been an increase in consumption of mango products such as juice, nectar, powder, canned mango slices in syrup, chutneys, etc. Processing of mango fruits generates a significant amount of by-product such as the peels and the seeds (Ayala-Zabala et al., 2011), which represent from 35% to 60% of the fruit, approximately (Larrauri et al., 1996). Several studies demonstrated that the mango by-products (peels and seeds) have a great deal of antioxidant activity attributed to their high bioactive compound content such as phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and sterols (Ajila et al., 2007; Maisuthisakul et al., 2009; Masibo and He, 2008; Soong and Barlow, 2004). These mango by-products rich in bioactive compounds have been studied as a safer natural alternative to synthetic food antioxidants in biscuits, buffalo ghee, vegetable oils and potato chips (Abdalla et al., 2007; Puranvankara et al., 2000). Therefore, mango by-products rich in bioactive compounds could be reused by food industries as ingredient for the formulation of functional foods.

There are many previous studies that have shown the influence of the mango variety on the phenolic composition of the different parts of the mango fruit. Thus, in mango peel of the Tommy Atkins variety different compounds were

identified using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) with electrospray ionization (ESI), mainly flavonol glycosides (quercetin and kaempferol derivatives and rhamnetin hexoside), xanthone glycosides (mangiferin derivatives), gallotannins and benzophenone derivatives (maclurin and iriflophenone glycosides) (Schieber et al., 2003; Soong and Barlow, 2004). Recently, Barreto et al. (2008) characterized the polyphenolic compound content in mango seed, peel, bark and leaves in 16 varieties of Brazilian mangos using HPLC Nano-ESI-MS. The compounds identified were also benzophenone derivatives such as maclurin and iriflophenone glycosides, xanthone glycosides like mangiferin and derivatives (homomangiferin, mangiferin, mangiferin gallate), gallates (gallic acid, methyl gallate, methyl gallate dimer), gallatannins, flavonoids (isoquercitrin, quercetin arabinopyranoside, quercetin arabinofuranoside, quercetin xyloside) and other compounds (ellagic acid and 3,4-dihydroxy benzoic acid). Berardini et al. (2005) carried out the study of the polyphenol profile in the peels of 14 different mango varieties from Africa, Asia, Australia and South America, and found significant qualitative and quantitative differences between varieties and origins. Thus, the Brazilian variety Tommy Atkins showed that xanthone C-glycosides derivatives, mainly mangiferin, were made up 31% of the total polyphenol content, and the rest 69% was formed by flavonols, mainly quercetin derivatives. However Kent variety, also a Brazilian variety, showed that the xanthone derivative fraction was less than 1% of the total and the majority was the quercetin *O*-glycoside fraction. In addition, several studies have shown that the content in flavonol and xanthone glycosides in the mango peels, at all maturity stages, is significant higher than in the mango pulp and seeds (Masibo and He, 2008; Ribeiro et al., 2008).

Besides the mango variety and the part of the fruit studied, the conditions of extraction and extraction technique employed could affect significantly the profile of bioactive compounds of the extracts. Most of the previous work on identification of compounds in mango has been carried out with extracts obtain using general extraction conditions not specific for mango by-products. For these reasons recent studies in peels and seeds of mango Keitt produced in the Canary Islands (Spain),

practically the only European region that produces and markets mango fruits, have been carried out with the aim of selecting the optimal extraction conditions to increase efficiency for obtaining extracts rich in antioxidant compounds (Dorta et al., 2011; Dorta et al., 2012; Dorta et al., 2013a; Dorta et al., 2013b).

In general, the analytical techniques used to identify polyphenol compounds in mango peels and seeds extracts had been HPLC coupled with diode array detection (Abdalla et al., 2007; Soong and Barlow, 2006) and HPLC-ESI-MS (Schieber et al., 2003; Berardini et al., 2004; Berardini et al., 2005; Barreto et al., 2008; Ribeiro et al., 2008). Nevertheless, for a more accurate characterization of phenolic compounds present in mango, it is essential the use of advanced and powerful techniques like high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation and quadrupole-time of flight-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). These techniques facilitate the exact mass measurement of both MS and MS/MS ions that provide essential information to characterize the structures of the phenolic compounds (El-Aneed et al., 2009).

In the case of mango by-products (peels and seeds), the relationship between the variety and the phenolic composition have scarcely been studied. Principal component analysis (PCA) could be a useful tool to study the influence of mango variety on the polyphenolic composition of the mango peels and seeds (Tufariello et al., 2012; Kara, 2009). Moreover, cluster analysis (CA) can provide deeper information about the relationship between the varieties and the polyphenolic composition.

The aim of this work was to identify the phenolic compounds present in the peels and seeds of three mango varieties (Keitt, Sensation and Gomera 3) produced in the Canary Islands (Spain) using HPLC-ESI-QTOF-MS. This characterization is an essential step for the utilization of these by-products as food ingredients.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Ethanol and acetone were purchased from HPLC grade from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain) and acetonitrile (HPLC-grade) was provided by Lab-Scan (Dublin,

Ireland). Formic acid of analytical grade was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deionised water of 18 M Ω cm resistivity, purified with a milli-Q system (Millipore, Bedford, USA), was used. All other reagents used were of analytical grade. Quercetin-3-*O*-glucoside, ellagic acid, gallic acid and mangiferin [2-*C*- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxy-xanthone] were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

2.2. *Plant material*

Three mango varieties (*Mangifera indica* L., Keitt, Sensation and Gomera 3) were obtained from fields located in Tenerife (Canary Islands, Spain) in 2007. The Canary Islands (Spain), along with the island of Sicily (Italy), are the only two European regions with subtropical climate that produced and marketed mango fruits. The fruits from different trees of each variety (20-25 pieces) were harvested at physiological maturity stage (mature-green) and allowed to ripen (full-ripeness or consumption stage) at 18 °C and 80-90% relative humidity. The ripeness stage of each mango variety was characterized by different parameters such as color, texture, total soluble solids (TSS), pH and titratable acidity as shown in Table 1, according to the methodology previously described (Dorta et al., 2011).

After the characterization performed on the consumption stage, the fruits were washed with tap water and drained. Then, the peels and the seeds (shell of fibrous endocarp, testa and embryo) were manually separated in accordance with the practices of processing industries, cut into small pieces (0.5 x 1 cm) and freeze-dried at -40 °C/50 MPa for five days (Dorta et al., 2012). The freeze-dried mango peels and seeds were ground to a fine powder (particle size between 355-500 μ m). The mango peel and seed powder was stored at -20 °C until the extractions and analyses were carried out.

2.3 *Preparation of extracts by microwave assisted extraction (MAE)*

The extracts from mango peel or seed were obtained by microwave-assisted extraction (MAE) (ETHOS 1, Milestone SRL, Sorisole, Italy) for 60 min, potency of 500 W. The extraction conditions have been previously optimised in terms of maximum extraction of polyphenol content and antioxidant capacity (Dorta et al.,

2013a, 2013b). The peel extracts from three mango varieties were obtained with ethanol:water (1:1,v:v) at 75 °C with weight-to-solvent volume of 1:50 (w:v) (extraction A) or 1:10 (w:v) (extraction B). The extraction of mango seeds was carried out with acetone:water (1:1, v:v) at 50 °C and weight-to-solvent volume of 1:30 (w:v) (extraction C).

In total, nine by-product extracts were studied and identified as follows: KPA (Keitt Peel, extraction A); KPB (Keitt Peel, extraction B); SPA (Sensation Peel, extraction A); SPB (Sensation Peel, extraction B); GPA (Gomera Peel, extraction A); GPB (Gomera Peel, extraction B); KSC (Keitt Seed, extraction C); SSC (Sensation Seed, extraction C); GSC (Gomera Seed, extraction C).

After each extraction, the solvent was separated by centrifugation (525 x g at 4 °C for 20 min) in Jouan CR-312 centrifuge (Thermo Electron Corporation, Madrid, Spain) and the supernatant reserved. The pellets were re-extracted two times more and the supernatants were combined and stored at -80 °C until the analyses were carried out.

After thawing, 2 mL of each crude extract was placed in a SpeedVac Concentrator (mod. Savant SPD131DDA-RVT4104TRAP, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) to remove the organic solvent at 40 °C. The extract (1 mL) after organic solvent elimination was loaded on a column (4.5 x 1 cm i.d.) packed with 1 g of Sephadex LH-20, which was equilibrated with methanol and water during 20 min before use. After loading the sample, the column was washed with 2 mL of deionized water to remove sugars. Phenolic compounds were recovered from the column by eluting with 4 mL of methanol. Effluents were evaporated to dryness under vacuum in a SpeedVac. The dried residue was dissolved in 1 mL of methanol and filtered through a 0.45µm syringe filter and stored at -80 °C until analysis. The extraction and HPLC analysis of each product was done at least in triplicate.

2.4. HPLC-ESI-QTOF-MS analysis

Chromatographic separation was performed on an Agilent 1200 series LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) consisting of a quaternary pump (G1311A), a solvent degasser (G1322A), an autosampler (G1367B), a thermostat

column compartment (G1316A) and diode-array detector (G1315B) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Separation was carried out on a reverse phase C18 Hypersil ODS stainless steel column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (Teknokroma, Barcelona, Spain) at a column temperature of 25 °C. The mobile phase consisted of 1% formic acid in Milli-Q-water (A) and 1% formic acid in acetonitrile (B). Separation was carried out in 70 min under the following conditions: 0 min, 100% A; 15 min, 75% A; 30 min, 70% A; 70min, 20% A; 65min, 0%A; 70min, 100% A. The column was equilibrated for 5 min prior to each analysis. The mobile phase flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 10 μL. UV detection was carried out at 280, 320 and 360 nm.

The HPLC system Agilent 1200 was coupled to a hybrid mass spectrometer quadrupole-time of flight Agilent Accurate Mass QTOF LC-MS via an electrospray ionization source (ESI) with JetStream technology. Mass spectra were recorded in the negative ionization mode over a mass range from m/z 100 to 1000. Ultrahigh pure nitrogen (N₂) was used as the collision gas and high-purity nitrogen (N₂) as the nebulizing gas. Mass spectra were recorded in the negative ionization mode. The scan source parameters were capillary voltage, 3.5 kV and fragmentor, 100. The ESI Jetstream parameters were: nitrogen pressure and flow-rate on the nebulizer at 45 psi and 10 l/min, respectively, with a drying gas temperature of 350 °C; sheath gas temperature, 250 °C; sheath gas flow, 6 L/min. MS/MS collision energies, 20 V.

The MS data were processed through Masshunter Data Acquisition B.04.00 software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) which provides a list of possible elemental formulas by using the Generate Molecular Formula editor according to the accurate masses and isotopic pattern. The formula generate with higher score percentage correspond to higher similarity between formula generate and compound. The overall correlation score gets calculated from individual scores for each fragment ion signal. For each fragment ion, one or multiple substructure candidates may be suggested and a “penalty” assigned based on how many and what bonds need to be broken to generate that substructure. Breaking two bonds, a double bond or even an aromatic ring carries a higher penalty (requires more energy and therefore is less likely) than just breaking one single bond. Two other

factors impacting the overall correlation score are the mass accuracy of the observed fragment ions and the overall percentage of fragment ion intensity that can be plausibly explained with substructures (Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator Software). The interpretation of the observed MS/MS spectra in comparison with those found in the literature and several online databases (Phenol-Explorer; ChemSpider, MassBank; Spectral Database for Organic Compounds) and by comparing chromatographic behaviour and mass spectral data generated by authentic standards or related structural compounds (when it was possible), were the main tools for phenolic compounds identification.

2.5. Statistical and multivariate analysis

Results were reported as mean \pm standard deviation of 3 independent determinations. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Principal component analysis (PCA) allowed reducing the dimensionality of the phenolic compounds identified and determining their relation with the mango variety, by-product (peels and seeds) and type of extraction studied. Data matrix M consisted in n cases defined by m variables. In this context, the cases were the nine by-product extracts (from peels and seeds of tree mango varieties obtained by extraction A, B and C) and the variables were the identified phenolic compounds. After peak finding, alignment, and filtering of raw data, a list of the ion intensities of all compounds with their corresponding retention time and m/z as identifier was generated. The resulting 3D data set was then exported to SPSS software (versions 19, SPSS Inc, IL, USA) for PCA analysis.

The new dimensions, PCs are built taking into account the maximum variance of data. The numbers of PCs are much lower than the number of the original variables (phenolic compounds), due to linear combination of the original variables. Cases plotted in the new space of PCs (score plot) show trends and explain the differences/similarities among varieties of mango by-products (peels and seeds), and, at the same time, original variables (phenolic compounds) plotted in the new

space of PCs (loadings plot) show which phenolic compounds contribute the most for such differences/similarities (Tufariello et al., 2012).

Cluster analysis (CA) allowed grouping the varieties in relation with phenolic compounds content. Hence CA is a pattern recognition technique that can be used to reveal the structure residing in a data set. Sample similarities were calculated on the basis of the squared Euclidean distance and the Ward hierarchical agglomerative method was used to establish clusters (Alonso et al., 2005).

PCA and CA were performed using SPSS software (versions 19, SPSS Inc, IL, USA).

3. Results and discussion

In this study, over thirty phenolic compounds extracted from peels and seeds of three different varieties of mango (Keitt, Sensation and Gomera 3) cultivated in Canary Island (Spain), have been separated and tentatively identified, as shown Table 2. The total ion chromatograms (TIC) of the peel extracts type B from the three mango varieties studied (Figure 1) showed a very similar phenolic profile among the varieties. Substantial qualitative differences in the phenolic profile of the peel extracts type A comparing with extracts type B were not detected (TIC of peel extracts type A were not shown). Figure 2 showed the TIC of the seed extracts type C of the three mango varieties and also the phenolic qualitative composition was very similar among varieties. Nevertheless, significant quantitative and qualitative differences were found between the peels and seeds extracts of each mango variety when comparing TICs (Figure 1 and Figure 2).

Table 2 shows the list of compounds identified using HPLC-ESI-QTOF-MS and summarize their retention times (rt), accurate mass ($[M-H]^-$), MS and MS/MS major fragments ions (m/z, %) and molecular formula (MF) generated by the software from the detected deprotonated molecule. The procedures employed for phenolic compounds identification were described in the materials and methods section.

Thus, a comprehensive study of most of the characterized compounds is described below according to their classification in five major groups.

3.1. Identification of phenolic compounds

3.1.1. *Flavonoids*. Flavonoids are phenolic compounds commonly found in plants and constitute a significant part of the human diet (Wojdylo et al., 2007). The antioxidant and anti-inflammatory capacities of these compounds are well documented (Heim et al., 2002; Seifried et al., 2007), and also their potential as cancer fighting molecules (Ramos, 2007).

Concerning the presence of flavonoids, the examination of the chromatograms in TOF-MS mode of peels and seeds of three mango varieties identified peaks **15**, **17**, **19**, and peaks **22-26** as quercetin derivatives. Also peaks **27** and **30** have been identified as compounds derived from rhamnetin.

Peak **15** showed a $[M-H]^-$ ion at m/z 595 in the ESI-MS mode and the ion m/z 301 in the MS/MS mode that is the predominant fragment caused by the cleavage of quercetin glycosides. According with the deprotonated molecule $[M-H]^-$, molecular formula generated $C_{21}H_{20}O_{12}$ and the fragmentation pattern, this compound was tentatively identified as quercetin-3-*O*-diglycoside (Chemspider, PubChem Compound). This compound has been previously described in mango peels by Schieber et al. (2003) and was present in all the mango peel varieties analysed in the present study but not in the seeds (Table 2).

Peaks **17** and **19** gave the same $[M-H]^-$ ion at m/z 463.0882 that corresponded with the molecular formula $C_{21}H_{20}O_{12}$ and also both showed the typical fragmentation of quercetin glycosides with fragment ions at m/z 301, and m/z 151, which were attributed to the loss of a hexose moiety $[M-H-162]^-$ and to the ion corresponding to retro-Diels-Alder fragmentation (Fabre et al., 2001). According to the mass spectrometric data and retention time in HPLC, peak **17** was identified as quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin) by comparison with the commercial standard. Probably peak **19** corresponded to quercetin-3-*O*-galactoside according with the deprotonated molecule $[M-H]^-$, the molecular formula generated, the fragmentation pattern and the assignment previously carried out by other authors (Berardini et al., 2004; Barreto et al., 2008). Compounds **17** and **19** were present in all the mango varieties and by-products analysed in the present study (Table 2).

The analysis of the chromatograms in TOF-MS mode confirmed the presence of three different quercetin pentosides ($C_{20}H_{18}O_{11}$), peaks **22**, **23** and **26**, that gave peaks at m/z 433.0776. The MS/MS mass spectrum of m/z 433.0776 showed peak at m/z 301 corresponding with the radical anion of the aglycone quercetin. Barreto et al. (2008) identified these compounds as quercetin xyloside, quercetin arabinopyranoside, and quercetin arabinofuranoside. Peaks **22**, **23** and **26** were found only in the peels of the three mango varieties but not in the seeds (Table 2, Figure 1).

In addition, quercetin 3-*O*-rhamnoside (quercitrin) (peak **24**) was also identified in the TOF-MS mode. Peak **24** gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 447.0933, that corresponded with the molecular formula $C_{21}H_{20}O_{11}$, and fragments at m/z 301 corresponding with the radical anion of the aglycone quercetin, but in this case attached to a desoxy hexose. This compound has been already mentioned in the literature about mango composition (Schieber et al., 2003). Quercitrin (peak **24**) and quercetin pentoside derivatives (peaks **22**, **23** and **26**) were identified in the peels of the three mango varieties but not in the seeds.

Quercetin-3-*O*-rutinoside was identified as peak **25** and gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 609.1813 and a main fragment at m/z 301 that is typical of the aglycon of quercetin glycosides. This compound was identified in all extracts of peels and seeds of the mangoes analysed. Quercetin-3-*O*-rutinoside also known as rutin, has been identified in many vegetal material such as tomato peel fiber (Navarro-González et al., 2011), citrus peel (Loizzo et al., 2012) and apple peel (Veberic et al., 2005). Although, a great number of quercetin derivatives have been found in different mango varieties (Schieber et al., 2003; Barreto et al., 2008), up to now quercetin-3-*O*-rutinoside has not been described in mango peels and seeds.

In addition to quercetin derivatives, rhamnetin derivatives have also been found in peel and seed extracts of the three mangos studied. The examination of chromatograms in TOF-MS mode revealed the presence of a peak at m/z 477.1038 with a molecular formula $C_{22}H_{22}O_{12}$ that corresponded to rhamnetin hexoside (peak **30**). The MS/MS mode showed ion fragments at m/z 315 and 314 that corresponded to the loss of a hexoside $[M-H-162]^-$. Berardini et al. (2005) identified

for the first time rhamnetin hexoside in mango peel. In the present study, the peel of the three mangos had rhamnetin hexoside but not the seeds.

Also, the analysis of the TOF-MS spectrum revealed the presence of peak **27** that gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 545.0583 and a fragmentation pattern with main fragments at m/z 477 and m/z 315, that correspond to rhamnetin hexoside and rhamnetin aglicon moieties, respectively. The fragmentation pattern of peak **27** was similar to that found for rhamnetin hexoside (peak **30**). Therefore, peak **27** and peak **30** could present similar structures although peak **27** was not possible to identify.

3.1.2 Xanthones. These compounds are the most powerful antioxidants known, and they are thought to be more potent than both vitamin C and vitamin E (Masibo & He, 2008). They have been described as strong scavengers of free radicals, with antimicrobial and anti-inflammatory activity, and with important properties as cancer chemopreventive, hepatoprotective and cardiovascular protection (Heim et al., 2002). Xanthones, a restricted group of plant polyphenols structurally similar to bioflavonoids, are present in bark, fruits, roots and leaves of *Mangifera indica* L., and a few other medicinal plants.

In the three mango varieties analysed only one xanthone was identified. Peak **12**, that gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 421.0776 with molecular formula $C_{19}H_{18}O_{11}$, was identified as mangiferin, a xanthone C-glycoside previously described in several studies as the main polyphenol in mango peels and seeds. Also, the molecular ion m/z 421 showed in the MS/MS mode the typical fragmentation of a C-glycosides with ions at m/z 301 $[M-H-120]^-$ and m/z 331 $[M-H-90]^-$ (Schieber et al., 2003; Berardini et al., 2004; Berardini et al., 2005; Ribeiro et al., 2008; Barreto et al., 2008). This compound was present in all the peels and seeds extracts studied in the present work, except in Sensation peel extraction B (SPB) (Table 2).

3.1.3. Ellagic acid and related compounds. Ellagic acid is a phenolic compound present in some fruits, nuts, seeds and berries, mainly strawberries and raspberries. In several works, the antioxidant, estrogenic and/or anti-estrogenic, anti-inflammatory, antimicrobial and prebiotic effects were tested (Landete, 2011).

The analysis in the TOF-MS mode confirmed the presence of ellagic acid (m/z 300.9990) (peak **18**). MS/MS spectrum of deprotonated molecule $[M-H]^-$ at m/z 301 showed the typical pattern fragmentation with the loss of $-CO_2$ giving $[M-H-44]^-$ at m/z 257 and the fragment ion at m/z 145 that correspond to the loss of two $-CO_2$ and four $-OH$ (Table 2).

In all peels and seeds mango extracts analysed were found peak **20** that gave $[M-H]^-$ ion at m/z 469.0524 and a fragment ions at m/z 301 and 169 which are typical of ellagic acid and gallic acid moieties, respectively. Peak **20** was tentatively as valoneic acid dilactone (Figure 3a) (Meyers et al., 2006). This was the first time that this compound was described in the peels and seeds of mangos.

3.1.4. Gallates and Gallotannins. Gallotannins, hydrolyzable tannins composed of a glucose core esterified with gallic acid residues, are a major component of phenolic compounds from mango seeds (Engels et al., 2012). Gallotannins have important beneficial health effects related with their antioxidative, anti-mutagenic, anti-cancer, anti-inflammation and anti-diabetic properties (Zhang et al., 2009).

The examination of the chromatograms in TOF-MS mode of peels and seeds of the three mango varieties revealed the presence different gallates and gallotannis compounds previously described in different mango varieties such as gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, methyl gallate ester, tetra-*O*-galloyl-glucoside, penta-*O*-galloyl-glucoside and ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate (Barreto et al., 2008).

Peak **2** was identified as gallic acid showing a $[M-H]^-$ ion at m/z 169.0142 and a major fragment ion at m/z 125 produced after the loss of a $-CO_2$ group (Meyers et al., 2006; Barreto et al., 2008).

Peak **7** gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 183.0299 and a major fragment ion $[M-H-59]^-$ at m/z 124 due to the loss of $-CO_2CH_3$ and was identified as methyl gallate (Barreto et al., 2008).

Peak **11** identified as ethyl gallate showed a $[M-H]^-$ ion at m/z 197.0455 and main fragments at m/z 169 and m/z 124, the typical fragments that determined the presence of gallic acid (Figure 3b). This compound has been previously found in

mango peel cultivar Carabao (Jiang et al., 2010). Ethyl gallate is one of the majority polyphenols of the peels, although it was also found in the seeds (Table 2).

Peak **13** gave $[M-H]^-$ ion at m/z 335.0409 and main fragments ions at m/z 183 and 124 suggesting the presence of a methyl gallate moiety. Peak **13** was identified as methyl gallate ester according with its molecular formula $C_{15}H_{12}O_9$. This compound was previously described by Barreto et al. (2008) in mango by-products. TOF-MS chromatogram showed peak **16** that gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 335.0409 with the same mass spectra characteristics than peak **13**, consequently it could be tentatively assigned to a methyl gallate ester isomer.

Tetra-*O*-galloyl-glucoside (peak **14**) and penta-*O*-galloyl-glucoside (peak **21**) were found in the TOF-MS chromatograms of all the mango by-products studied in this work. Peak **14** showed $[M-H]^-$ ion at m/z 787.0999 with molecular formula $C_{34}H_{28}O_{22}$ and peak **21** gave $[M-H]^-$ ion at m/z 939.1109 with molecular formula $C_{41}H_{32}O_{26}$. The MS/MS chromatogram of peak **14** showed a fragment ions at m/z 635 and 617 caused by the loss of galloyl (152 amu) (amu = atomic mass unit) and gallic acid (170 amu) moieties, respectively. Peak **21** showed a similar fragment ions patterns with ions at m/z 787 and 769 caused by the loss of galloyl (152 amu) and gallic acid (170 amu) moieties, respectively. These two compounds were also described by Barreto et al. (2008) in mango bark, kernel, leaves and peel of 16 Brazilian mango varieties.

Peak **28** showed $[M-H]^-$ ion at m/z 349.0576 and ion fragments at m/z 197 and m/z 169. These fragments indicated the presence of ethyl gallate and gallic acid, respectively. This compound was tentatively identify as ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate (Chemspider, PubChem Compound) (Figure 3c) and was found in all peels and seed extracts of the three mango varieties analysed.

In the peels and seeds of mangoes Keitt, Sensation and Gomera-3 have been found other gallates and gallotannis that are very common in the plant kingdom, however they have not been described before in the peels and seeds of mangoes such as galloyl glucose, di-galloyl glucose, theogallin and ethyl *p*-trigallate.

Galloyl glucose (peak **1**) gave $[M-H]^-$ ion at m/z 331.0671 and a fragment ion at m/z 169 which is typical of gallic acid. This compound has been also found in *Rhus coriaria* extracts (Regazzoni et al., 2013).

Peak **3** was identified as theogallin (a galloylquinic acid) showing a $[M-H]^-$ ion at m/z 343.0590 and a major fragment ions at m/z 192 due to the loss of galloyl moiety (152 amu) and m/z 91 (Figure 3d). This compound has been also found in black and green tea (Clifford et al., 2007).

Two isomers of di-galloyl glucose (peak **5** and **6**) gave $[M-H]^-$ ion at m/z 483.079 and produced two characteristic fragments at m/z 331 and m/z 169. The first fragment is produced by the loss of galloyl moiety (152 amu) and the second after the loss of a gallic acid moiety. Di-galloyl glucose has been found and characterized in *Rhus coriaria* extracts by Regazzoni et al (2013).

Peak **29** gave a $[M-H]^-$ ion at m/z 501.0691 and fragments at m/z 349 and m/z 197 that corresponded to an ethyl gallate fragment, thus this compound was identified as ethyl *p*-trigallate. Lin et al. (2002) described and identified ethyl *p*-trigallate in *Koeleria paniculata* Laxm leaves.

3.1.5. Benzophenone derivatives and related compounds. The benzophenones are major intermediates in the biosynthetic pathway of xanthenes, and have been rarely reported to occur outside the *Clusiaceae* and *Moraceae* family. Benzophenones exhibit cytotoxic, antimicrobial, antiviral and antioxidant activities (Acuña et al., 2012).

Four benzophenone compounds (peaks **4**, **8**, **9** and **10**) were identified in the peels and seeds extracts of the three mango varieties showing $[M-H]^-$ ion at m/z 423.0945 (peak **4**), m/z 575.1042 (peak **8**), 559.1109 (peak **9**) and m/z 727.1152 (peak **10**) (Table 2). All these compounds have been previously separated and identified in mango by-products (Berardini et al., 2004; Barreto et al., 2008).

In MS/MS mode, peak **4** gave ion fragments at m/z 303 and 333 caused by the loss of 120 and 90 amu that corresponding to fragments from the glucose moiety, representing the characteristic fragmentation of C-glycoside substances. Two main fragments loss of 110 amu generated product ions at m/z 193 and 223.

The molecular formula $C_{19}H_{20}O_{11}$ and pattern fragmentation are consisted with maclurin-3-C- β -D-glucoside.

Peak **8** have been identified as maclurin-3-C-(2-O-galloyl)- β -D-glucoside and the major fragment ion was at m/z 303. The loss of 272 amu [M-H-120-152] indicated the presence of galloylated benzophenone.

Peak **9** shown molecular formula $C_{26}H_{24}O_{14}$ and pattern fragmentation corresponding to iriflophenone-3-C-(2-O-galloyl)- β -D-glucoside. The MS/MS chromatogram presented fragments ions at m/z 407 and 389 indicated the loss of galloyl (152 amu) and gallic acid (170 amu) moieties, respectively. Other fragments ions were found at m/z 287 and 317 resulting from the loss of 120 and 90 amu that correspond to C-glucosidal moieties, respectively (Table 2).

Peak **10** that showed a [M-H]⁻ ion at m/z 727.1152 and the molecular formula $C_{29}H_{30}O_{15}$ was a digalloyl benzophenone derivative known as maclurin-3-C-(2,3-di-O-galloyl)- β -D-glucoside. The major fragment detected was at m/z 575 caused by the loss of 152 amu indicating the presence of galloyl. The resulting fragments at m/z 575 provided product ions at m/z 407 indicating the presence of a further gallic acid moiety.

Maclurin-3-C- β -D-glucoside (peak **4**), maclurin-3-C-(2-O-galloyl)- β -D-glucoside (peak **9**) and maclurin-3-C-(2,3-di-O-galloyl)- β -D-glucoside (peak **10**) were found in the seeds of the three mango varieties analysed and not in all the peels extracts (Table 2).

3.2. Distribution of the phenolic compounds identified in the peels and seeds of three mangoes varieties cultivated in Spain

The extraction procedures (A, B and C) employed in the present study were selected based on the greater antioxidant capacity of the mango extracts according to the methodology and results previously described in Dorta et al. (2013a, 2013b). The total ion intensity (TII) detected in the nine extracts of the peels and seeds of three mango varieties analyzed have been shown in Figure 4. In general, extraction B increased the TII of the mango peels approximately 210% in Keitt, 230% in Sensation and 137% in Gomera 3, when compared with extraction A results. The

peel extract with the highest TII was Sensation type B (SPB), followed by Gomera-3 (GPB) and Keitt (KPB). Also the seed extracts of Sensation (SSC) showed the highest TII, followed by Keitt seeds (KSC) and Gomera 3 seeds (GSC). In general, the seed extracts showed a TII significantly much lower than their respective peel extracts. Thus, TII seed extracts, were 92% (Gomera 3), 80% (Keitt) and 50% (Sensation) lower than their respective peel extracts (Figure 4).

When analysing the composition of the peel extracts by families in terms of TII, it is noted that the main phenolic fraction were the gallates and gallotannins that varied from 64% in GPA to 84% in SPB and KPB (Figure 5). The next fractions in descending order of participation in TII were flavonoids ranging from 10% (SPB) to 19% (GPA), followed by ellagic acid ranging from 3% (GPB, SPB, KPB) to 8% (SPA) and xanthenes from 10% in GPA to less than 1% in KP, SP and GPB. The lower contribution corresponded to benzophenones that varied from 0.3 % (SPA) to 4% (GPB).

It is remarkable that extracts B of the three mango peels varieties presented greater percentage of gallates, gallotannis and benzophenone fractions than extracts A, meanwhile the percentage of flavonoid, ellagic acid products and xanthenes fractions were lesser (Figure 5).

In general, the peel extracts (extractions A and B) of the three mango varieties studied presented all the compounds shown in Table 2, except seven compounds that corresponded to three benzophenones, peak **4**, **8** and **9**, three gallate compounds, peaks **5-6** and **29** and one xanthone identified as mangiferin (peak **12**). All these compounds were not found in Sensation peels, except peak **4** (maclurin-3-C- β -D-glucoside) that was not found in KPA (Table 2).

The two major predominant compounds in the peel extracts of Gomera 3 (GP), Keitt (KP) and Sensation (SPB) were ethyl gallate (peak **11**) and ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5)- trihydroxybenzoyl)oxybenzoate (18-21%) (peak **28**), followed by a rhamnetin derivative (7-11%) (peak **27**), methyl gallate ester (7-9%) (peak **16**) and penta-*O*-galloyl-glucoside (peak **21**) (3-7%). The exception was SPA that showed methyl gallate (40%) (peak **7**) as the main compound followed by ethyl gallate (20%)

(peak **11**) (Figure 1). Also, Jiang et al. (2010) found ethyl gallate and penta-*O*-galloyl-glucoside as the main compounds in the mango peel extracts of Carabao cultivar.

Although the extracts of mango peels have been previously described as a valuable source of mangiferin and further xanthone glycosides (Schieber et al., 2003; Ribeiro et al., 2008), these xanthones were not the main compounds in the peels extracts of Keitt, Sensation and Gomera 3 varieties. In fact, mangiferin (peak **12**) was the only xanthone significantly detected in the extracts A of Gomera 3 peels (GPA) with a 10% of TII, being less than 1% in the extracts of Keitt and Sensation peels (Figure 1).

In general, gallates and gallatannins were also an important fraction in the seeds of Sensation (86%), Keitt (60 %) and Gomera 3 (32%). The predominant compounds in the seeds extracts according to their participation in the TII were methyl gallate (peak **7**) ranging from 33% in (Keitt) to 56 % in Sensation, followed by penta-*O*-galloyl-glucoside (peak **21**) (6-11%). In Gomera 3 seeds the major compounds were the flavonoid compound rhamnnetin derivative (peak **27**, 49%) and methyl gallate (peak **7**, 10%) (Figure 2).

In the mango seed extracts were not identified the majority of the flavonoids found in mango peels such as quercetin-3-arabinoglucoside, quercetin pentoside derivatives, quercetin-*O*-rhamnoside and rhamnnetin hexoside (peaks **15**, **22**, **23**, **24**, **26** and **30**). One benzophenone identified as iriflophenone 3-C(2-*O*-galloyl) β -D-glucoside (peak **9**) and the gallotannins and gallates derivatives, di-galloyl-glucose isomers (peaks **5** and **6**) and ethyl *p*-trigallate (peak **9**), were not found in the seed extracts of Keitt, Sensation and Gomera 3 as well.

In general, penta-*O*-galloyl-glucoside was found as the gallotannin with higher molecular weight in the peels and seeds of mangos cultivated in Spain extracted using a microwave assisted procedure with 50% ethanol. This behaviour is more in agreement with the results found by Barreto et al (2008) with Brazilian mangoes, which employed a Soxhlet extraction with methanol, than with the results obtained by Berardini et al. (2004) that used a cold extraction with 70% acetone that produced a great number of galotannins with high molecular weight. Furthermore, the flavonoid profile of the peels and seeds of the three mango varieties agrees

with those reported in the literature for other mango varieties (Berardini et al., 2004; Barreto et al., 2008). The low presence of mangiferin in the three mango varieties studied was expected taking into account the great variability found between mango varieties relative to the concentration of this compound. Thus, Berardini et al. (2005) showed that the concentration of mangiferin in the several mango varieties studied ranged from 11.2 mg/kg d.m. in Haden to 1297 mg/kg d.m. in Chok Anan.

It is remarkable that eight of the 30 phenolic compounds separated and identified in the peel and seed of Gomera 3, Sensation and Keitt, as far as it is known, have not been reported before in mango. These compounds were: galloyl glucose and two digalloyl glucose compounds; theogallin, valoneic acid dilactone and ethyl *p*-trigallate; quercetin-3-*O*-rutinoside and a rhamnetin derivate. It should be taken in mind that the comparison of the results obtained in the present work with other mango published results is difficult since there are no previous studies on the phenolic compounds of these three mango varieties Keitt, Sensation and Gomera 3.

3.3. Multivariate analysis

3.3.1 Principal Component Analysis (PCA).

PCA was applied to establish the relationship between the parts of the three mango varieties analyzed (peels and seeds) and the ion intensity of the phenolic compounds identified by HPLC-ESI-QTOF-MS. Two main principal components (PC) characterized the phenolic composition of the nine extracts obtained from the peels and seeds of the three mango varieties, with a cumulative explained total variance of 75.14%. PC1 component (52.47%) and PC2 (22.70%) (Figure 6a). The loadings plot showed the loadings/correlations values between the phenolic compounds and the PC (Figure 6a) (Kara, 2009). The PC1 was mainly characterized for flavonoids and benzophenones. The PC2 related principally to gallates and gallotannins.

The score plot allowed exploring the correlations between the PCs and the parts of mango analysed (peels and seeds). The PCA results showed in Figure 6b and permitted to determine which compounds discriminate the nine mango extracts studied.

The peel extracts from all mango varieties obtained with extraction A (KPA, GPA and SPA) and seed of varieties Keitt (KSC) and Gomera 3 (GSC) had low score in PC2 that has been related with lower content in gallates and gallotannins. Nevertheless, the extraction B of Keitt peel (KPB) and Sensation peel (SPB) had high score in PC2, therefore it had the presence of gallates and gallotannins. Sensation seed (SSC) presented a balanced content of both groups of compounds. However, the extracts B of Gomera 3 peel (GPB) was characterized by high content in flavonoids and benzophenones derivatives (Figure 6b). In general, these results suggest that extraction A facilitated the extraction of flavonoids and benzophenones derivatives and extraction B the extraction of gallates and gallotannins, but this conclusion could be modulated by the mango variety analyzed. These results agree with the data discussed in the previous section.

3.3.2. Cluster Analysis (CA).

CA is commonly applied with other multivariate techniques, such as PCA. CA describes data structure and reveals the natural groups that exist in a data set on the basis of the information provided by the measured variables. The samples were grouped in clusters in terms of their nearness or similarity. The square Euclidean distance was used for calculating similarities between samples and Ward's method was used as a clustering method. Similar results to PCA were obtained after application of cluster analysis (Figure 6c). Three natural groups were obtained from cluster analysis. Group 1: KPA, SPA, GPA, KSC, GSC; Group 2: GPB and Group 3: SSC, KPB, SPB. This result showed that five of the nine extracts analyzed, that were clustered as Group 1 (KPA, SPA, GPA, KS, GSC), presented a similar phenolic profile which was different to that obtained for peel by the extraction procedure B (Group 2 and 3). Also these results showed that the phenolic profile of Sensation seed extract was more similar to Keitt and Sensation type B than those obtained by extraction type A. Therefore, the results confirmed that in this case, the effect of extraction method has a greater influence in the phenolic content than variety and the part of the mango fruit analyzed.

4. Conclusions

Nine phenolic fractions of the peels and seeds of three mango varieties cultivated in the Canary Islands (Spain) and obtained by three different extraction systems were studied for the first time with high resolution HPLC-ESI-QTOF-MS. This method allowed separating and identifying 30 phenolic compounds including gallates, gallatannins, flavonoids, xanthenes, benzophenones, gallic acid and derivatives, eight of which, as far as it is known, have not been reported before in mango peels and seeds.

In general, the two major predominant compounds in the peel extracts of Keitt, Sensation and Gomera 3 mango varieties were ethyl gallate and ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5)-trihydroxybenzoyloxybenzoate. In the seeds of Keitt and Sensation, methyl gallate and penta-*O*-galloyl-glucoside were the main compounds meanwhile a rhamnnetin derivative was the principal compound in Gomera 3 seeds.

Regarding extraction systems tested in the three mango peels, extraction B presented greater percentage of gallates, gallotannis and benzophenone fractions than extraction A, meanwhile decreased the percentage of flavonoid, ellagic acid products and xanthenes fractions. This result agreed with PCA analysis. The PCA results permitted to determine which phenolic compounds differentiate the nine mango extracts studied. In general, this result suggested that the extraction method had a greater influence in the phenolic content than variety and the part of the mango fruit analyzed.

The results obtained revealed HPLC-ESI-QTOF-MS method employed was successfully applied to separated and identify the bioactive phenolic compounds from by-products (peels and seeds) of Keitt, Sensation and Gomera 3. Thus, taking into account the results obtained in this study and others previously published related to the same mango varieties (Dorta et al., 2013a, 2013b) these by-products (peel and seed) in powder form could be bioactive ingredients for the food industry.

Acknowledgements

Eva Dorta acknowledges the Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) for awarding the PhD INIA grant. This work

has been financially supported by the INIA through I+D+i RTA2006-00187 Project and by the Spanish Ministry of Science and Innovation through Project AGL2010-15910 (subprogram ALI). This study was also partially funded by Consolider-Ingenio 2010, FUN-C-FOOD, CSD2007-00063. Eva Dorta also acknowledges to Professor Roberto Dorta (Statistic and Computation Department of the Mathematics Faculty of University of La Laguna) for his assistance in statistical analysis.

References

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., El-Hamahmy R. M. (2007). Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chemistry*, *103*, 1134-1140.
- Acuña, U. M., Dastmalchi, K., Basile, M. J., Kenelly, J. E. (2012). Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC-PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, *25*, 215-220.
- Ajila, C. M., Naidu, K.A., Bhat, S. G., Prasada Rao, U. J. S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, *105*, 892-988.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Wasim Siddiqui, M. D., Dávila-Aviña, J. E., González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit by-products as a source of food additives. *Food Research International*, *44*, 1866-1874.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G.; De Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spielhalder, B., Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 5599-5610.
- Berardini, N., Carle, R., Schieber, A. (2004). Characterization of galloytannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by high-performance liquid

- chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *18*, 2208-2216.
- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1563-1570.
- Clifford, M.N., Stoupi, S., Kuhnert, N. (2007). Profiling and Characterization by LC-MSn of the Galloylquinic Acids of Green Tea, Tara Tannin, and Tannic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2797-2807.
- Dorta, E., Lobo, M. G., González, M. (2011). Reutilization of mango by-products: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, *77*, C80-C88.
- Dorta, E., Lobo, M. G., González, M. (2012). Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, *45*, 261-268.
- Dorta, E., Lobo, M. G., González, M. (2013a). Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from mango seed. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 1067-1081
- Dorta, E., Lobo, M. G., González, M. (2013b). Improving the efficiency of antioxidant extraction from mango peel by using microwave-assisted extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, accepted.
- El-Aneed, A., Cohem, A., & Banoub, J. (2009). Mass spectroscopy, Review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, *44*, 210-230.
- Engels, C., Gänzle, M.G., & Schieber, A. (2012). Fast LC-MS analysis of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels and effects of methanolysis on their antibacterial activity and iron binding capacity. *Food Research International*, *45*, 422-426.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffman, E., Quetin-Leclerq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid

- chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 12, 707-715.
- FAOSTAT (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Agriculture Statistics, from: <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>.
- Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., Bobilya, J. D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 13, 572-584.
- Jiang, L.Y., He, S., Pan, Y.J., Sun, C.R. (2010). Bioassay-guided isolation and EPR-assisted antioxidant evaluation of two valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 119, 1285-1292.
- Kara, D. (2009). Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry*, 114, 347-354.
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44, 1150-1160.
- Larrauri J. A., Rupérez P., Borroto B., Saura-Calixto F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 29, 729-733.
- Lin, W.L., Deng, Z.H., Lei, H.M., Fu, H.Z., Li, J. (2002). Polyphenolic compounds from the leaves of *Koelreuteria paniculata* Laxm. *Journal of Asian Natural Products Research*, 4, 287-295.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C., Menichini, F. (2012). Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2960-2967.
- Maisuthisakul, P., Gordon, M.H. (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*, 117, 332-341.
- Masibo, M., He Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 309-319.

- Meyers, K.J., Swiecki, T.J., Mitchell, A.E. (2006). Understanding the native Californian diet: Identification of condensed and hydrolysable tannins in tanoak acorns (*Lithocarpus densiflorus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 7686-7691.
- Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., Periago, M.J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, *44*, 1528-1535.
- Puranvankara, D., Boghra, V., Sharma, R. S. (2000). Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 522-526.
- Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *18*, 427-442.
- Regazzoni, L., Arlandini, E., Garzon, D., Santagati, N.A., Beretta, G., Facino, R.M. (2013). A rapid profiling of gallotannins and flavonoids of the aqueous extract of *Rhus coriaria* L. by flow injection analysis with high-resolution mass spectrometry assisted with database searching. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *72*, 202-207.
- Ribeiro, S. M. R.; Barbosa, L. C. A.; Queiroz, J. H.; Knödler, M.; Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, *110*, 620-626.
- Schieber, A., Berardini, N., Carle, R. (2003). Identificación of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5006-5011.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *18*, 567-579.
- Soong, Y. Y., Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, *88*, 411-417.

- Soong, Y. Y., Barlow, P. J. (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*, 524-530.
- Tufariello, M., Capone, S., Siciliano, P. (2012). Volatile components of Negroamaro red wines produced in Apulian Salento area. *Food Chemistry*, *132*, 2155-2164.
- Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, D., Stampar, S. (2005). Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*, 1687–1694.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, *105*, 940–949.
- Zhang, J.; Li, L.; Hagerman, A. E.; Lü, J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *National Institute of Health*, 2009, 26(9), 206.

Figuras y Tablas

Parameters	Keitt	Gomera	Sensation
Peel Color ^{*2}			
L*	63 ± 9a	56 ± 5b	64 ± 6a
h°	168 ± 14a	93 ± 11b	91 ± 11b
C*	38 ± 4b	44 ± 6a	40 ± 9b
Pulp Color ^{*2}			
L*	86 ± 4b	59 ± 4c	90 ± 5a
h°	91 ± 6a	85 ± 2b	88 ± 2b
C*	83 ± 2a	60 ± 7b	86 ± 3a
Deformation (°Durofel)	70 ± 9c	75 ± 10b	81 ± 14a
Penetration (N)	60 ± 18b	140 ± 19a	128 ± 12a
pH	4.8 ± 0.1a	4.5 ± 0.1c	4.6 ± 0.1bc
Total Soluble Solids (°Brix)	20 ± 2a	16 ± 3c	17 ± 4bc
Titrateable Acidity (mg citric acid/ 100g)	176 ± 26a	173 ± 42c	171 ± 42bc

Table 1. Physical and physicochemical characteristics of Spanish mango varieties at consumption stage¹

¹Data are expressed as the mean ± SD (n = 3). Different lower case letters in the same row indicate significant differences (P < 0.05).

^{*2} lightness (L*), hue angle (h°), chromaticity (C*)

Peak	Tentative Identification	Sample**	HPLC-ESI-QTOF				
			Rt	[M-H] ⁻	Major fragment ions m/z (%)	MF	Score
1	Galloyl glucose	KSG	8.3	331.0671	169(100), 151(41), 89(19)	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	92.93
2	Gallic acid*	KSG	9.2	169.0142	125(100), 79(26), 69(13)	C ₇ H ₆ O ₅	98.83
3	Theogallin	KSG	10.8	343.0590	192(9), 91(100)	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	90.18
4	Maclurin 3-C-β-D-glucoside	KPB, GP, KS, SS, GS	14.3	423.0945	333(19), 303(100), 223(7), 193(44), 169(11)	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₁	Barret O ^Δ
5	Di-galloyl-glucose	KP, GP, SPB	15.8	483.0793	169(100), 125(10)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	95.52
6	Di-galloyl-glucose	KP, GP, SPB	16.4	483.0793	169(100), 125(10)	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	95.52
7	Methyl gallate	KSG	17	183.0299	124(100), 78(6)	C ₈ H ₈ O ₅	96.93
8	Maclurin 3-C(2-O-galloyl)β-D-glucoside	KP, GP, SPA, KS, SS, GS	17.7	575.1042	423(34), 407(30), 303(100), 285(80), 193(26), 169(34)	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₅	91.12
9	Iriflophenone 3-C(2-O-galloyl)β-D-glucoside	KP, GP, KS	21.3	559.1109	407(63), 389(13), 317(21), 287(100), 269(57), 245(9), 169(56)	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₄	Barret O ^Δ
10	Maclurin 3-C(2,3-di-O-galloyl)β-D-glucoside	KSG	21.9	727.1152	575(100), 407(9), 303(8), 169(7)	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₉	91.33
11	Ethyl gallate	KSG	24.2	197.0455	169(13), 125(51), 124(100)	C ₉ H ₁₀ O ₅	94.96
12	Mangiferin*	KP, GP, SPA, KS, SS, GS	25	421.0776	331(88), 301(100), 271(12), 183(6)	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	96.37
13	Methyl gallate ester	KSG	27.7	335.0409	183(100), 124(8)	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	97.44
14	Tetra-O-galloyl-glucoside	KSG	35.8	787.0999	635(39), 617(100), 465(16), 300(5), 169(16)	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	Barret O ^Δ
15	Quercetin 3-O-diglycoside	KP, GP, SP	36.4	595.1305	595(100), 301(20), 300(74)	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	94.91
16	Methyl gallate ester	KSG	38.7	335.0409	183(100), 124(8)	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	97.44
17	Quercetin-3-O-glucoside (Isoquercitrin)*	KSG	39.7	463.0882	301(72), 300(100), 179(6), 151(7)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	90.28

Table 2. Polyphenolic compounds identified in the peels and seeds extracts of three Spanish mango varieties by HPLC-ESI-MS- QTOF in the Negative-Ion Mode. * Comparison with standards. **Peak**, compound number; **rt**, retention time; **MF**, molecular formula; **Score**, percentage of proximity of the molecular formula generated by Masshunter software with the exact mass and the isotopic distribution; ^Δ Author described this compound. ****Sample**, mango extract where the compound has been identified: KSG, present in all the extracts analyzed; KP (Keitt Peel, extraction A and B); KPA (Keitt Peel, extraction A); KPB (Keitt Peel, extraction B); SP (Sensation Peel, extraction A and B); SPA (Sensation Peel, extraction A); SPB (Sensation Peel, extraction B); GP (Gomera Peel, extraction A and B); GPA (Gomera Peel, extraction A); GPB (Gomera Peel, extraction B); KS (Keitt Seed); SS (Sensation Seed); GS (Gomera Seed)

18	Ellagic acid	KSG	40	300.9990	300(100), 257(5), 164(7), 145(5)	C ₁₄ H ₆ O ₈	98.71
19	Quercetin-3-O-galactoside	KSG	40.3	463.0882	301(72), 300(100), 179(6), 151(7)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	90.28
20	Valoneic acid dilactone	KSG	41.5	469.0524	433 (62), 301 (100), 169 (48)	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	Meyer S ^Δ
21	Penta-O-galloyl-glucoside	KSG	41.5	939.1109	787(83), 769(100), 617(16), 770(28)	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	Barret O ^Δ
22	Quercetin pentoside	KP, GP, SP	41.7	433.0776	301(82), 300(100)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	89.71
23	Quercetin pentoside	KP, GP, SP	42.0	433.0776	301(82), 300(100)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	89.71
24	Quercetin 3-O-rhamnoside (Quercitrin)	KP, GP, SP	42.5	447.0933	301(97), 300(100), 285(31), 284(24), 255(8), 197(12)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	93.36
25	Quercetin-3-O-rutinoside	KSG	42.8	609.1813	302(19), 301(100), 169(6)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	90.78
26	Quercetin pentoside	KP, GP, SP	43.0	433.0776	301(82), 300(100)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	89.71
27	Rhametin derivative	KSG	44.1	545.0583	477(100), 315(29), 314(29), 169(27)	C ₂₄ H ₁₈ O ₁₅	-----
28	Ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate	KSG	45.8	349.0576	198 (12), 197(100), 169(6), 124(5)	C ₁₆ H ₁₄ O ₉	91.35
29	Ethyl p-trigallate	KP, GP, SPB	50	501.0691	349(16), 197(100)	C ₂₃ H ₁₈ O ₁₃	86.69
30	Rhamnetin hexoxide	KP, GP, SP	50.2	477.1038	315(90), 314(100), 299(16), 169(12)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	93.91

Table 2 (continued). Polyphenolic compounds identified in the peels and seeds extracts of three Spanish mango varieties by HPLC-ESI-MS- QTOF in the Negative-Ion Mode.

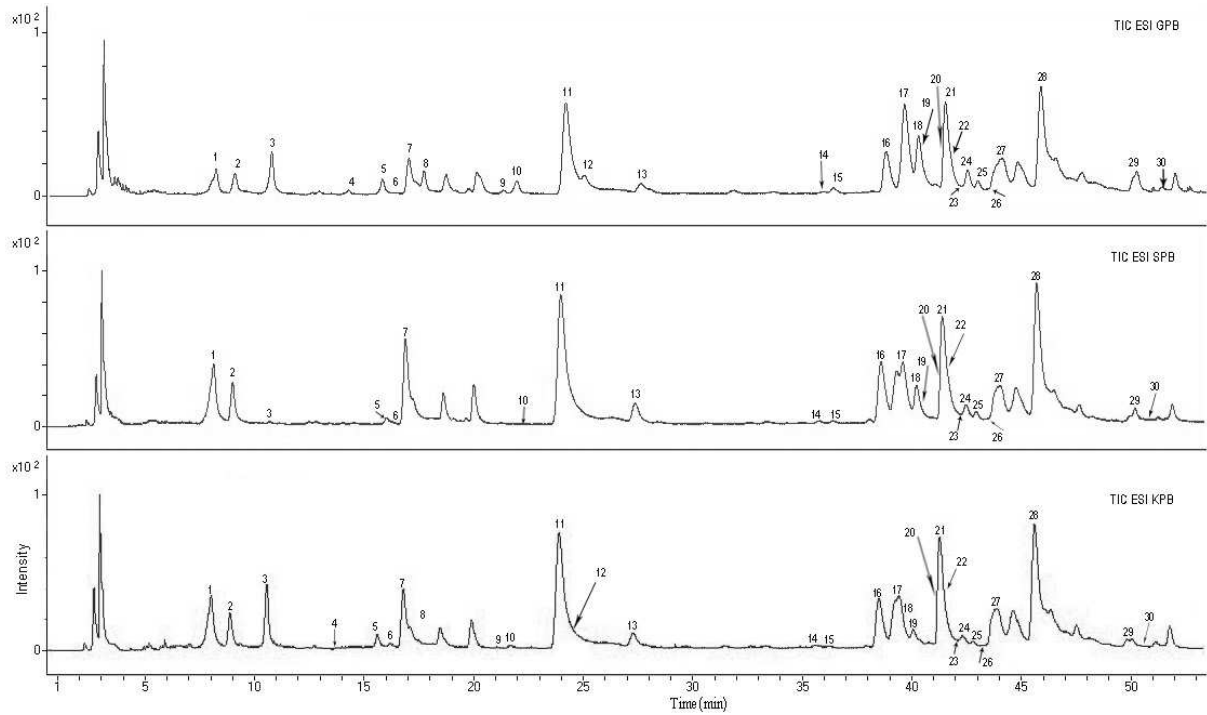


Figure 1. Total Ion Chromatogram of peel extracts B of Gomera 3, Sensation and Keitt obtained by HPLC-ESI-MS. For peak assignment see Table 2.

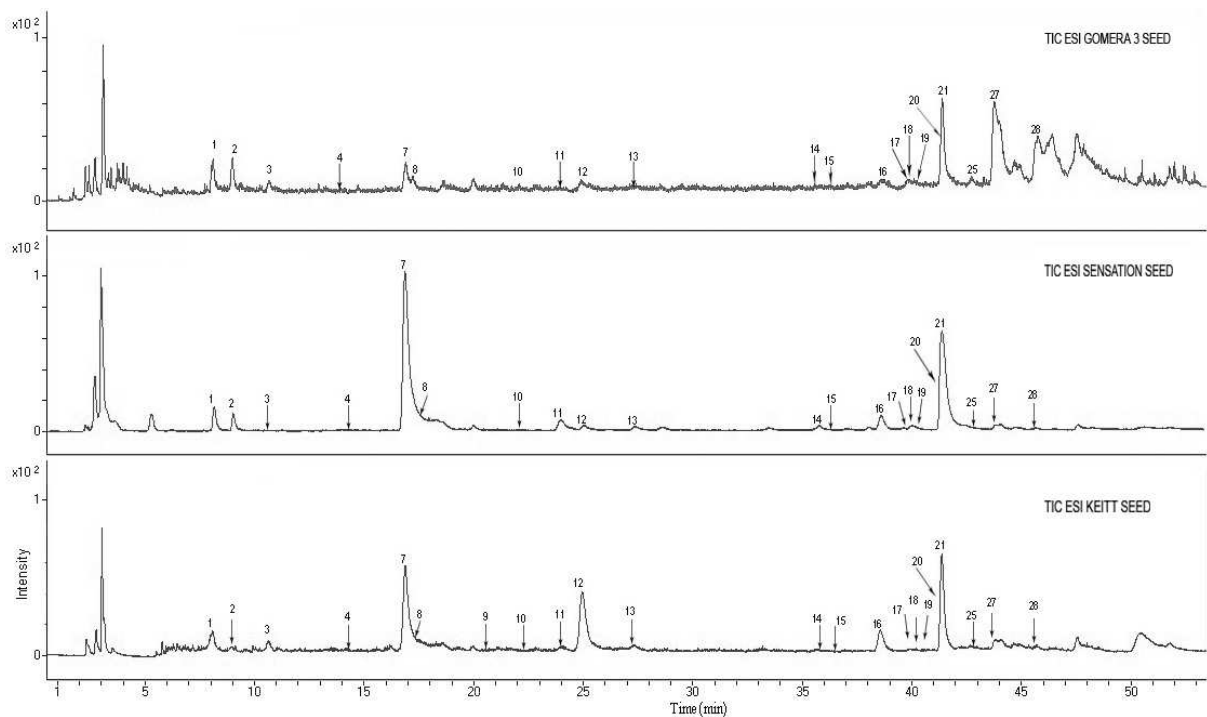


Figure 2. Total Ion Chromatogram (TIC) of seed extracts of Gomera 3, Sensation and Keitt obtained by HPLC-ESI-MS. For peak assignment see Table 2.

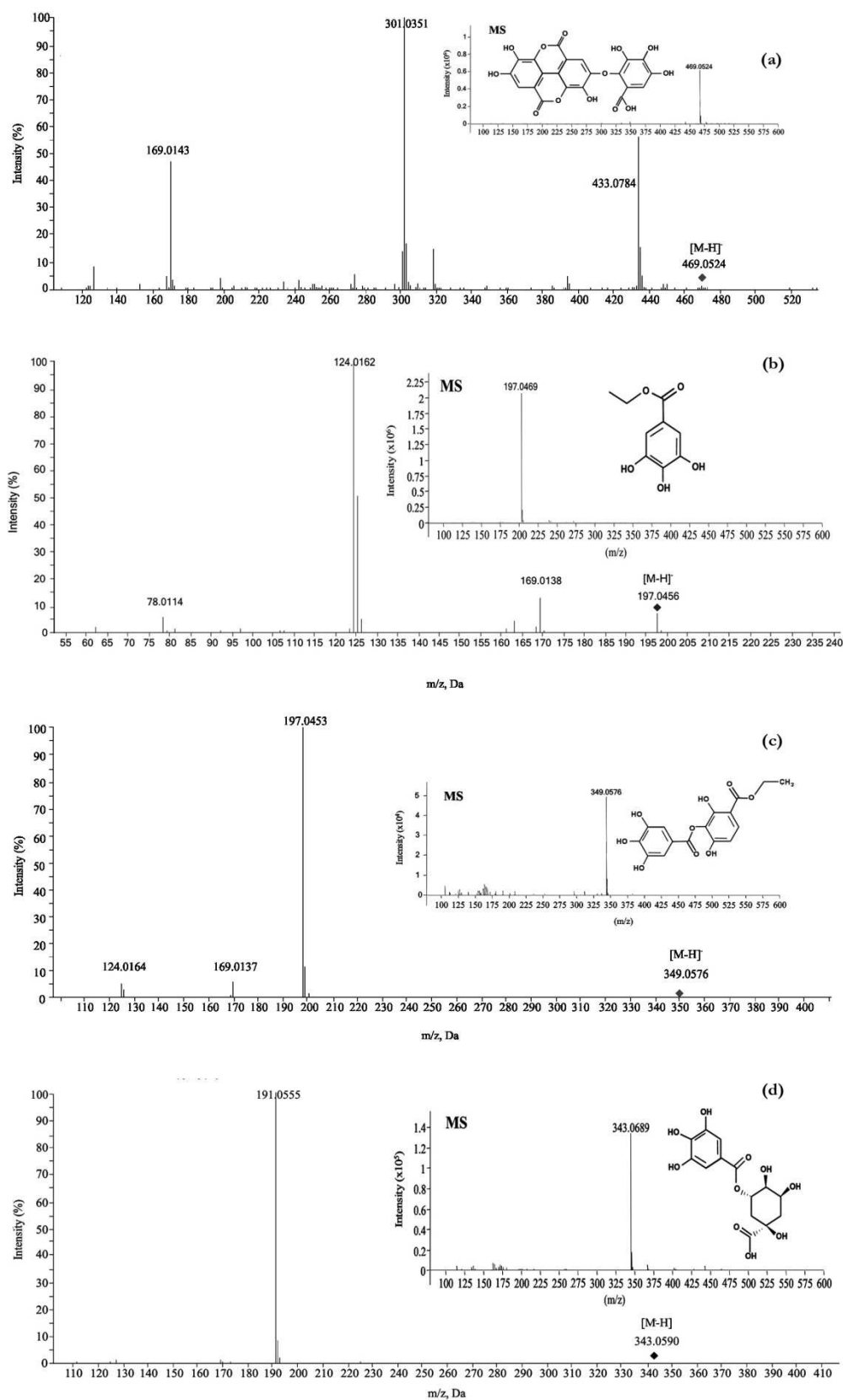


Figure 3. MS, MS/MS and proposed chemical structures for the identification of valoneic acid dilactone (a), ethyl gallate (b), ethyl 2,4-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoate (c) and theogallin (d)

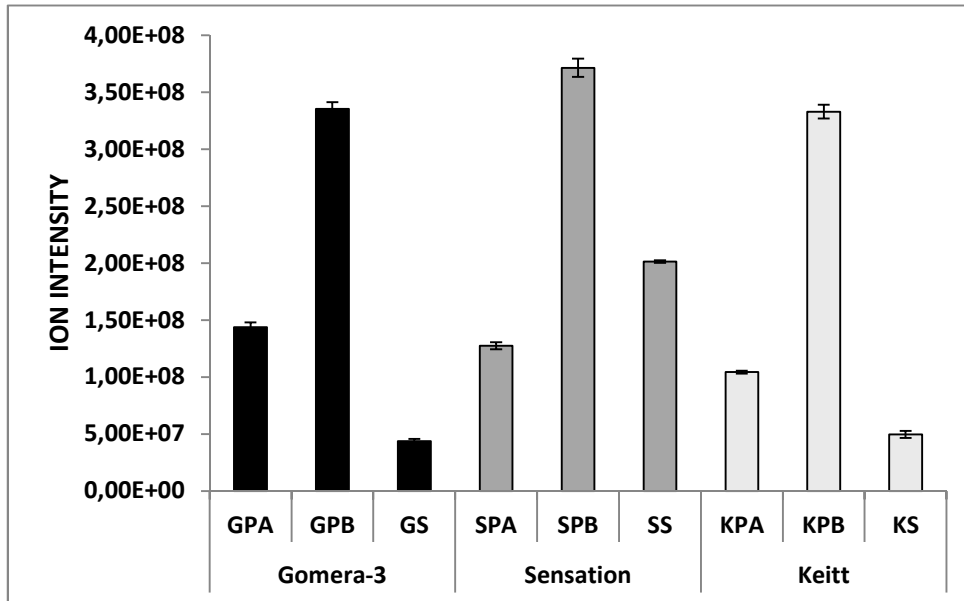


Figure 4. Total Ion Intensity (TII) of the peels and seeds of Gomera 3, Sensation and Keitt.

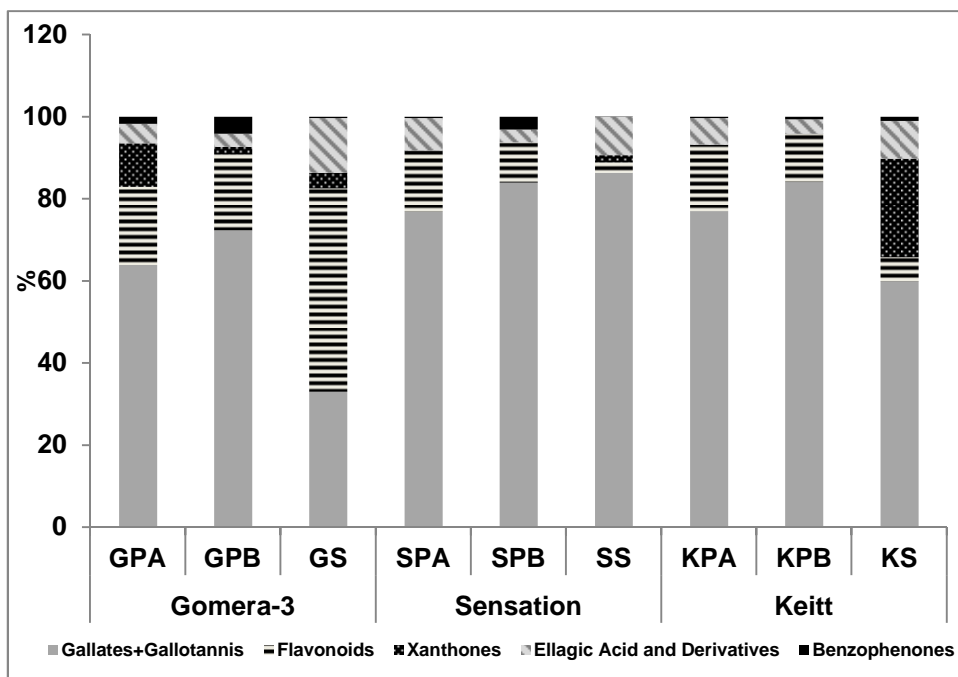


Figure 5. Distribution of the principal polyphenolic compounds in the peels and seeds of Gomera 3, Sensation and Keitt.

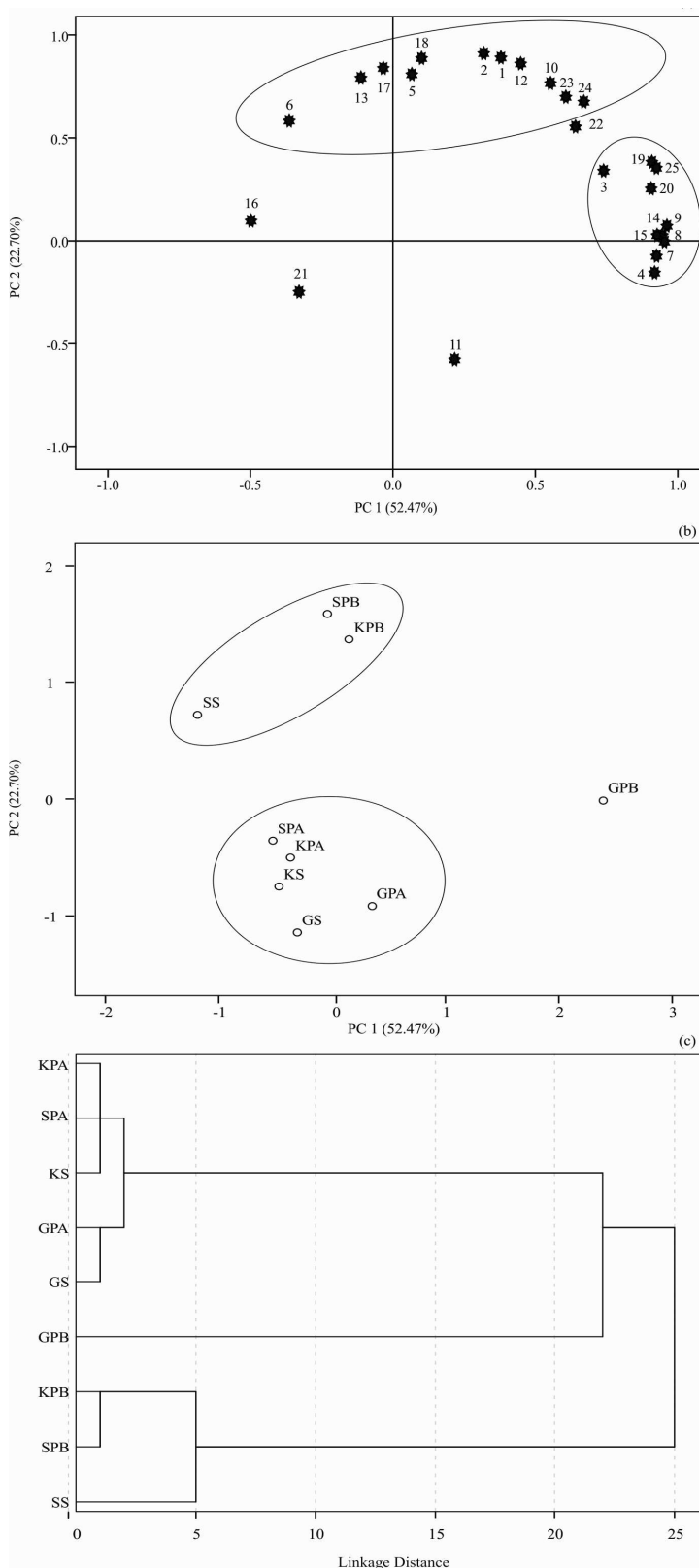


Figure 6. Factor loading plots resulting of principal component analysis of phenolic compounds present in samples of mango peel and seed (a). Score plot of the principal components and distribution of samples of mango peel and seed (b). Dendrogram resulting from a cluster analysis selecting the Euclidean distance as similarity measurement and Ward's method as amalgamation rule, applied to all mango peel and seed studied (c).