

OPTIMIZACIÓN DE LA DESHIDRATACIÓN Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE PIEL DE MANGO

Nicole Febres Burneo^a, María Mora-Medina^a y Jorge G. Figueroa^{a,*} 

^aDepartamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, 11-01-608 Loja – Loja, Ecuador

Recebido em 10/08/2021; aceite em 20/10/2021; publicado na web em 18/11/2021

OPTIMIZATION OF DEHYDRATION AND EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM MANGO PEEL. Mango peel, a by-product obtained from the industrialization of this fruit, is a promising and inexpensive source of phenolic compounds. In the present study, both the drying of the mango peel and the extraction of phenolic compounds were optimized using the response surface methodology. In this sense, temperature and charge/area ratio were selected as depend variables to drying process. Instead, for the ultrasonic assisted extraction (UAE) the temperature, ethanol-water concentration and time were optimized. For both processes, the total phenolic content (TPC) and mangiferin concentrations were the response variables. The TPC and the xanthone concentration were determined by the Folin-Ciocalteu method and HPLC-ESI-IT-MSⁿ, respectively. The optimal conditions for the dehydration process were 54 °C and 2.3 kg m⁻², reaching a TPC of 21.7 ± 1.6 mg GAE g⁻¹ dw and a concentration of mangiferin of 1.94 ± 0.22 mg g⁻¹ dw. Regarding to UAE, the optimum conditions were 51 °C, 50% ethanol and 71 min. Under these conditions, the TPC was 19.5 ± 0.8 mg GAE g⁻¹ dw and the mangiferin concentration corresponded to 1.50 ± 0.13 mg g⁻¹ dw. Additionally, 38 compounds were identified in the extract obtained under optimal conditions.

Keywords: by-product; *Mangifera indica* L.; mangiferin; polyphenols; response surface methodology.

INTRODUCCIÓN

El Mango es la fruta de mayor importancia económica en la familia Anacardiaceae,¹ y debido a sus inigualables cualidades organolépticas y su elevado valor nutricional se lo ha denominado “El Rey de las frutas”.² Por muchos años, la atención de las industrias se ha centrado en la pulpa, convirtiéndose en la base de un sinnúmero de productos tales como: jugo, néctar, rebanadas de mango en almíbar, formulaciones para comida de bebe, saborizante de productos lácteos, etc.³ Sin embargo, la producción de estos alimentos genera grandes toneladas de subproductos, principalmente piel y semilla, que, al ser desechados como residuos, representan una fuente de contaminación ambiental.⁴ Actualmente, existen evidencias que demuestran que estos subproductos al ser ricos en compuestos fenólicos, pueden ser reutilizados como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales y nutracéuticos, gracias a los múltiples beneficios que estos aportan a la salud humana.⁵ Ahora bien, el alto contenido de agua presente en la piel de mango, hace que este subproducto sea susceptible a descomposición durante el almacenamiento,⁶ siendo la deshidratación, una técnica clave para disminuir la actividad de agua a un nivel que disminuya las reacciones de deterioro.⁷

Por otro lado, las altas temperaturas y los tiempos prolongados asociados a los métodos convencionales de extracción como la maceración sólido-líquido y Soxhlet, han estimulado la búsqueda de nuevas técnicas que sean compatibles con los requerimientos de la industria alimentaria y farmacéutica, es decir, métodos sostenibles, menos tóxicos y que generan un impacto ambiental positivo.⁸ La extracción asistida por ultrasonido (UAE) emerge como una excelente alternativa a los métodos tradicionales gracias a su simplicidad y eficiencia.⁹ Además, permite obtener una alta reproducibilidad en menor tiempo, reduce significativamente en el consumo de solvente, y tiene un menor aporte energético.¹⁰

Sin embargo, es necesario optimizar los parámetros para realizar una UAE exitosa. En este sentido, la metodología de superficie de

respuesta es considerada como una herramienta estadística exitosa cuando se desea optimizar un proceso.¹¹ La principal ventaja de este método es que, al reducir los ensayos experimentales, es menos laboriosa y, por lo tanto, requiere menos tiempo que otros enfoques utilizados para optimizar procesos.¹²

Teniendo en cuenta las razones antes mencionadas, el presente estudio buscó optimizar los procesos de deshidratación y extracción de compuestos fenólicos de piel de mango por la técnica UAE, que permitan obtener un extracto rico en antioxidantes.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó etanol, acetona y ácido clorhídrico suministrados por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y metanol proveniente de Pareack Applichem (Barcelona, España). Los reactivos utilizados en la cuantificación de fenoles totales: reactivo Folin Ciocalteu, ácido gálico y carbonato de sodio fueron obtenidos de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Por otra parte, para la identificación del perfil fenólico y optimización de mangiferina por HPLC se utilizó acetonitrilo (ACN) grado HPLC procedente de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y ácido acético obtenido de J.T. Baker Analyzed. Se utilizó el estándar de mangiferina suministrado por Sigma-Aldrich (Misuri, USA).

Muestras

En la presente investigación se trabajó con mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tommy Atkins”), adquirido en un local comercial del catón Catamayo, provincia de Loja, Ecuador. La muestra se lavó y luego se sometió a un proceso de escaldado a 75 °C por 8 min con el fin de reducir la actividad enzimática.¹³ Posteriormente, se separó mecánicamente la piel del resto de la fruta e inmediatamente fueron deshidratadas. El estado de madurez de la fruta fue evaluado mediante el análisis de sólidos solubles y acidez titulable según los métodos

*e-mail: jgfigueroa@utpl.edu.ec

AOAC 932.12 y AOAC 942.15, respectivamente. El contenido de humedad se determinó siguiendo el protocolo descrito en el método AOAC 934.06.¹⁴

Optimización del proceso de deshidratación

Se optimizó el proceso de deshidratación utilizando metodología de superficie de respuesta (MSR). Para ello, se empleó un diseño central compuesto (DCC), debido a que permite comprender las interacciones entre los parámetros que se van a optimizar.¹⁵ Las variables seleccionadas fueron: temperatura (40-70 °C) y relación carga/área (1,80-3 kg m⁻²), mientras que el contenido de fenoles totales y mangiferina fueron las variables de respuesta seleccionadas. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo de forma aleatoria, para minimizar los efectos de la variabilidad en las respuestas observadas.

La deshidratación de la piel de mango se realizó hasta obtener un contenido de humedad menor al 10% y una actividad de agua entre 0.3 y 0.4. Esta operación se llevó a cabo en un deshidratador tipo bandejas con circulación de aire caliente (DY-110H, Lassele, Korea). Las condiciones ensayadas se detallan en la Tabla 1. Además, como control del proceso, se deshidrató la piel de mango en un liofilizador (7754047, Labconco, USA). Posteriormente, las muestras deshidratadas se trituraron en un molino ultracentrífugo hasta un tamaño de partícula < 500 µm (ZM 200, RTSCH, Alemania), dimensión que facilita la extracción de los compuestos fenólicos.¹⁶

Tabla 1. Diseño Central Compuesto para la optimización del proceso de deshidratación

Experimento	Temperatura (°C)	Carga/Área (kg m ⁻²)	TPC (mg GAE g ⁻¹ bs)	Mangiferina (mg g ⁻¹ bs)
1	55	3.0	19.4	0.94
2	40	2.4	20.6	1.39
3	66	2.8	19.8	1.31
4	55	2.4	22.4	1.95
5	44	2.0	20.8	1.54
6	55	2.4	21.9	1.81
7	44	2.8	20.6	1.33
8	55	2.4	22.5	1.84
9	55	2.4	21.6	1.80
10	55	2.4	22.2	1.80
11	66	2.0	21.4	1.38
12	55	1.8	20.7	1.12
13	70	2.4	21.6	1.31
Condiciones Óptimas				
Modelo	54	2.3	22.1	1.84
Experimental			21.7 ± 1.6	1.94 ± 0.22

La extracción de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto.¹⁷ Brevemente, se pesó 1g de muestra en un tubo de centrifuga y se adicionó 20 mL de una disolución metanol-agua (50:50 v/v, pH 2 acidificados con HCl). Se extrajo durante 1 hora a 200 rpm empleando un agitador horizontal (3018, GFL) y luego se realizó la separación de fases utilizando la centrifuga (Sorvall ST8, ThermoFisher Scientific, USA) a 8700 rpm por 30 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y, al residuo se le agregó 20 mL de acetona: agua (70:30 v/v), al cual nuevamente se lo agitó y se centrifugó hasta obtener un nuevo sobrenadante. Finalmente, los sobrenadantes se combinaron y almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Optimización del proceso de extracción

Una vez optimizado la operación de deshidratación, se optimizó el proceso de extracción de compuestos fenólicos de piel de mango. Como técnica de extracción se seleccionó la extracción asistida por ultrasonidos. Las variables independientes estudiadas fueron, temperatura de extracción (25-60 °C), relación etanol-agua (0-100%) y el tiempo de extracción (5-120 min). Las variables dependientes seleccionadas fueron el contenido de fenoles totales y mangiferina. Se utilizó el diseño Box-Behnken (DBB), metodología que permite una optimización rápida, económica y eficiente cuando se desea estudiar los efectos de tres o más variables.¹⁸

Las extracciones se llevaron a cabo en un baño de ultrasonidos (FS30D, Fisher Scientific, USA) con una frecuencia de 42 kHz y a 100 W de potencia. En un tubo de centrifuga se pesó 1 g de muestra y se agregó 20 mL del solvente de acuerdo con las concentraciones indicadas en la Tabla 2. Posteriormente, las muestras se extrajeron con las diferentes temperaturas y tiempos indicados por el DBB e inmediatamente después se centrifugaron a 8700 rpm durante 30 min. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se recogieron para la determinación de fenoles totales y mangiferina.

Determinación del contenido de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Figueroa *et al.*⁷ Se utilizó ácido gálico para construir la curva de calibración. Los resultados obtenidos se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g⁻¹ base seca).

Cuantificación de mangiferina por HPLC-ESI-IT-MSⁿ

Para el análisis de mangiferina se utilizó un HPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoScientific, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones equipado con una unidad de ionización por electrospray (ESI) (Amazon Speed, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La separación se realizó utilizando una columna C18 de dimensiones 150 mm x 3,0 mm x 3 µm (Sunfire, Waters, USA). Las condiciones se fijaron de acuerdo a los descrito por Gómez-Caravaca *et al.*¹⁹ Brevemente, la fase móvil A consistió en agua con 0,1% de ácido acético v/v, y la fase móvil B fue acetonitrilo. Las condiciones de elución fueron: 0 min, 0% B; 5,5 min, 6,8% B; 16 min, 20% B; 20 min, 25% B; 25 min, 35% B; 29 min, 100% B; 36 min, 100% B; 38 min, 0% B; 40 min, 0% B. El volumen de inyección fue de 10 µL y el caudal se ajustó a 0,4 mL min⁻¹. La columna fue mantenida a 30 °C.

El análisis espectrométrico de masas se realizó en modo ultrascan. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: polaridad iónica: negativa; presión del nebulizador: 6 psi; flujo de secado del gas (N₂): 6 L min⁻¹; temperatura de secado: 200 °C; voltaje capilar: 3500 V; desplazamiento de la placa final: 500 V y rango de escaneado: 100-1000 m/z. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el software Compass DataAnalysis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estado de madurez de las frutas tiene efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos.²⁰ En este sentido, previo a la optimización de los procesos de deshidratación y extracción, se evaluó el grado de madurez de la fruta utilizada. Indudablemente, la relación °Brix/acidez es un indicador confiable para estudiar este parámetro en

Tabla 2. Diseño Box-Behnken para la optimización de la extracción de compuestos fenólicos

Experimento	EtOH (%)	Time (min)	Temperatura (°C)	TPC (mg GAE g ⁻¹ bs)	Mangiferina (mg g ⁻¹ bs)
1	50	120.0	25.0	8.9	0.90
2	50	62.5	42.5	20.0	1.20
3	100	120.0	42.5	6.5	0.60
4	50	5.0	60.0	11.2	1.00
5	0	62.5	25.0	7.6	0.60
6	0	120.0	42.5	5.9	0.60
7	50	120.0	60.0	16.0	1.10
8	100	5.0	42.5	2.3	0.40
9	100	62.5	60.0	9.8	0.70
10	50	62.5	42.5	19.8	1.20
11	50	5.0	25.0	14.3	0.90
12	0	62.5	60.0	5.6	0.70
13	100	62.5	25.0	4.8	0.50
14	0	5.0	42.5	5.7	0.60
15	50	62.5	42.5	18.3	1.20
Condiciones óptimas					
Modelo				19.37	1.22
Experimental	50	71.0	51.0	19.5 ± 0.8	1.50 ± 0.13

matrices vegetales. De los análisis realizados, en el presente estudio se pudo determinar una relación °Brix/acidez de 22.1 ± 0.4 , lo que confirma que la materia prima presentó un estado de madurez óptimo para su consumo.²¹

Optimización del proceso de deshidratación

El contenido de humedad inicial de la piel de mango fue $80.73 \pm 1.30\%$, valor cercano al reportado por Sogi *et al.*,⁵ de 83.37% . Debido a este elevado contenido, fue imprescindible realizar un proceso de deshidratación para reducir este contenido a valores inferiores a 10% , con el propósito de evitar el deterioro por microorganismos y retardar procesos enzimáticos propios del subproducto.¹³ Además, se conoce que la piel de mango es rica en compuestos fenólicos. Por lo tanto, con la finalidad de reducir el deterioro de este tipo de compuestos durante la deshidratación, es necesario optimizar el proceso de deshidratación. En esta investigación, se seleccionó la temperatura de deshidratación y

la relación carga/área como variables independientes. Los rangos evaluados se fijaron en base a estudios previos. Respecto a la temperatura, el valor superior ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$) estuvo limitado por la capacidad del deshidratador, mientras que, para la selección del límite inferior ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$), se consideró que, a temperaturas bajas, se necesitan tiempos más prolongados de deshidratación, lo que conlleva a una degradación de los compuestos fenólicos.⁷ Con respecto a la relación carga/área, el rango seleccionado estuvo en función al utilizado en el estudio realizado por Saavedra *et al.*,²² quienes optimizaron el proceso de deshidratación de los subproductos de aguacate (piel y semilla).

Luego del proceso de deshidratación, el TPC y la concentración de mangiferina variaron desde 19.4 hasta $22.5\text{ mg EAG g}^{-1}$ de piel de mango y desde 0.94 hasta 1.95 mg g^{-1} de piel de mango, respectivamente. En las Figuras 1 a y b, se ilustra el efecto de la temperatura y la relación carga/área sobre el TPC y la concentración de mangiferina, respectivamente. Como se puede apreciar, existe un aumento en las variables respuesta analizadas cuando las temperaturas de deshidratación son cercanas a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la relación

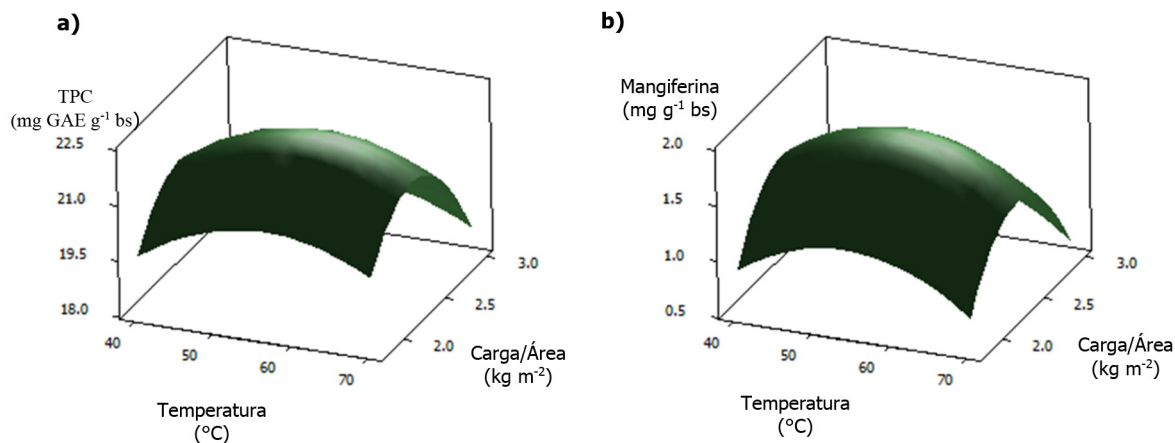


Figura 1. Gráficos de superficie de respuesta que muestran el efecto de la temperatura de deshidratación y relación carga/área sobre: a) TPC y b) concentración de mangiferina

carga/área es aproximadamente 2.5 kg m^{-2} (Figura 1). Sin embargo, superado estos límites se produce un descenso notorio en las variables respuesta. Esto se debe principalmente, a la degradación térmica de los compuestos fenólicos presentes en la muestra,²³ y a la unión de estos compuestos a estructuras proteicas.²⁴ Miranda *et al.*,²⁵ deshidrataron semillas de quinua utilizando diferentes condiciones de temperatura ($40\text{-}80 \text{ }^\circ\text{C}$), y encontraron una reducción en el contenido fenólico cuando a valores superiores a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, resultado similar al que se obtuvo en el presente trabajo. Además, Saavedra *et al.*,²² evaluaron el efecto de la temperatura, carga/área y velocidad de aire sobre el contenido fenólico de la piel y semilla de aguacate, y observaron un contenido máximo de fenoles totales cuando la relación carga/área es 2 kg m^{-2} , comportamiento similar al obtenido en este estudio.

Con la finalidad de identificar los términos que tienen efecto sobre las variables de respuesta (TPC y mangiferina), se utilizó un análisis de varianza (Tabla 1S, Material Suplementario). En este sentido, se observó que la temperatura (X_1) y la relación carga/área (X_2), así como, ambos términos cuadráticos (X_1^2 y X_2^2) ejercieron efecto significativo sobre el TPC y concentración de mangiferina. Además, la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$), lo que indica que el diseño propuesto es adecuado para describir los datos experimentales. Por otra parte, los coeficientes de determinación señalaron que el 88.2% y 91.2% de las variaciones totales producidas en la experimentación, pueden ser explicados por las Ecuaciones 1 y 2 para el TPC y mangiferina, respectivamente:

$$\text{TPC} = -22.128 + 0.492X_1 + 26.394X_2 - 0.004X_1^2 - 5.728X_2^2 \quad (1)$$

$$\text{Mangiferina} = -20.129 + 0.264X_1 + 13.38X_2 - 0.002X_1^2 - 2.804X_2^2 \quad (2)$$

En base al modelo generado las condiciones óptimas de extracción fueron $54 \text{ }^\circ\text{C}$ y carga/área de 2.3 kg m^{-2} , con respuestas predichas de $22.1 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ bs}$ y $1.84 \text{ mg g}^{-1} \text{ bs}$, para el TPC y mangiferina, respectivamente. Además, para comprobar la validez del modelo matemático, se ensayó la deshidratación de la piel con las condiciones óptimas, con las cuales se obtuvo un TPC de $21.7 \pm 1.6 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ bs}$ y $1.94 \pm 0.22 \text{ mg g}^{-1} \text{ bs}$ de mangiferina. En definitiva, no existió diferencia estadística entre los valores predichos y experimentales, lo que confirma la validez de los modelos encontrados.

Ahora bien, sabiendo que los compuestos fenólicos son termolábiles,²⁶ se comparó el efecto de la deshidratación con aire caliente (condiciones óptimas) con el proceso de liofilización

(muestras con y sin tratamiento enzimático) sobre el TPC y concentración de mangiferina de la piel de mango. La liofilización combina el uso de bajas temperatura y presión, lo que permite conservar y retener atributos sensoriales y nutricionales de los alimentos.²⁷ Características que hacen que este procedimiento sea ampliamente utilizado frente a la deshidratación con aire caliente, debido a que este último usualmente provoca pérdida de nutrientes.²⁸ Como se puede observar en la Figura 2, la deshidratación con aire caliente bajo las condiciones óptimas permite obtener valores estadísticamente similares a los observados con la muestra liofilizada con tratamiento enzimático, convirtiendo a la deshidratación con aire caliente en una opción rentable para el aprovechamiento de este subproducto debido a su bajo costo de equipamiento y operación.²⁹ Por otro lado, se observa que el tratamiento enzimático aplicado a la muestra en etapas previas para inactivar enzimas presentes, produce un descenso notorio en el TPC, posiblemente debido a la solubilización inducida de los compuestos durante este proceso.³⁰ En contra parte, para mangiferina no se evidenció esta reducción, esto debido a que la mangiferina es escasamente soluble en agua.³¹

Optimización del proceso de extracción

Una vez optimizado el proceso de deshidratación, se procedió a definir las condiciones de extracción, que nos permitan maximizar la cantidad de compuestos fenólicos extraídos. Como variables independientes se seleccionaron el solvente de extracción (Y_1), tiempo (Y_2) y temperatura (Y_3). De igual manera, el TPC y concentración de mangiferina fueron las variables respuesta. Los rangos evaluados se seleccionaron en base resultados previos. Ahora bien, los solventes de extracción se eligieron en función de su seguridad, costo y disponibilidad. En este caso, se utilizó solventes GRAS (generalmente reconocidos como seguros) como el etanol y el agua. Solventes compatibles con la industria alimenticia. Respecto a la temperatura, el valor superior ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) estuvo limitado por la capacidad del equipo de ultrasonidos. Además, Chen, Zhao y Yu³² señalaron que temperaturas superiores a $65 \text{ }^\circ\text{C}$, provocan una degradación de los compuestos bioactivos. Finalmente, el tiempo de extracción máximo fue de 120 min, debido a que periodos más prolongados involucran un aumento en los costos de energía y operativos del proceso.³³

Los resultados alcanzados se muestran en la Tabla 2. Como se puede observar el contenido de fenoles totales varió desde 2.3 hasta $20.0 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ bs}$ de piel de mango deshidratada, mientras que la concentración de mangiferina varió desde 0.40 hasta $1.20 \text{ mg g}^{-1} \text{ bs}$. Nuevamente, los valores más elevados para las variables analizadas

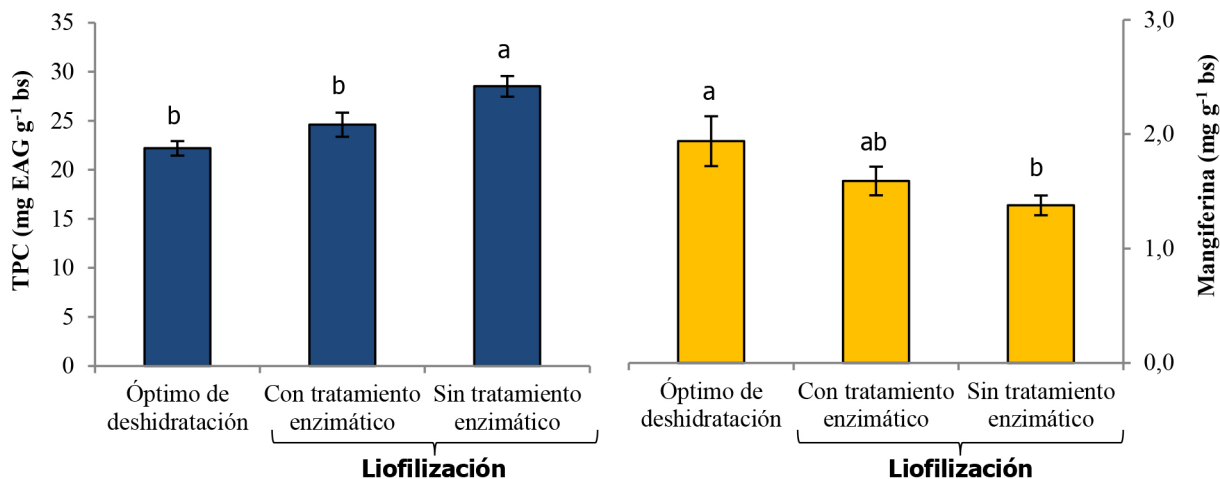


Figura 2. Efecto de los diferentes métodos de deshidratación en el contenido fenólico. Los valores marcados por letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

se observaron cerca del punto central del diseño experimental, es decir 50% EtOH, 62.5 min y 42.5 °C.

La importancia estadística de los factores utilizados se estimó mediante un análisis de varianza (Tabla 2S, Materias Suplementario), encontrando que todos los términos presentaron efecto para el TPC y/o concentración de mangiferina. Se obtuvieron modelos matemáticos cuadráticos completos con un excelente ajuste ($p > 0.15$). Además, los coeficientes de determinación indicaron que más del 98% de las variaciones de las variables están explicadas por el modelo.

Las Ecuaciones 3 y 4 se utilizaron para predecir el TPC y mangiferina, respectivamente.

$$\text{TPC} = -0.467 + 0.288Y_1 + 0.046Y_2 + 0.468Y_3 - 0.004Y_1^2 - 0.001Y_2^2 - 0.008Y_3^2 + 0.0003Y_1Y_2 + 0.002Y_1Y_3 + 0.0025Y_2Y_3 \quad (3)$$

$$\text{Mangiferina} = 0.179 + 0.017Y_1 + 0.004Y_2 + 0.019Y_3 - 0.0002Y_1^2 - 0.00004Y_2^2 - 0.0002Y_3^2 + 0.00003Y_1Y_2 + 0.00004Y_1Y_3 + 0.0001Y_2Y_3 \quad (4)$$

Por otro lado, para evaluar las interacciones entre los diferentes factores estudiados sobre las variables respuesta (fenoles totales y mangiferina), se construyeron las gráficas tridimensionales de superficie correspondientes (Figura 3). Respecto a la interacción solvente y tiempo de extracción, existe un incremento en ambas variables respuesta conforme la concentración de etanol y tiempo de extracción se acercan a 55% EtOH y 80 min. Sin embargo, al superar estos valores se produce una disminución en las variables de estudio (Figuras 3 a y d). Liu *et al.*,¹⁰ observaron un comportamiento similar al evaluar las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos presentes en la semilla de *Euryale ferox*.

Con relación a las variables concentración de etanol y la temperatura de extracción, se puede apreciar que la cantidad de ambas variables respuesta alcanzaron un máximo cuando el solvente utilizado contiene un 55% EtOH y la temperatura es aproximadamente 55 °C. Al igual que en el caso anterior, es evidente una disminución en las variables, siendo está más marcada para la variable concentración

de etanol (Figuras 3 b y e). Este resultado es similar al encontrado en piel de uva por Ghafoor y Choi,³⁴ quienes observaron un contenido fenólico máximo a 55 °C y 50% EtOH.

Finalmente, las Figuras 3 c y f reflejan el efecto del tiempo y la temperatura de extracción, sobre la concentración de fenoles totales y mangiferina. Un incremento en las variables respuesta se alcanza hasta un tiempo de 80 min y temperatura de extracción de 55 °C. Una vez superados estos límites se produce un descenso en las variables estudiadas. Esta relación también se observó en la determinación de las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos presentes en las hojas de mora.³⁵

Las condiciones que permitieron maximizar el contenido fenólico y mangiferina extraídos de la piel de mango fueron 50% EtOH, 71 min y 51 °C (Tabla 2). Bajo estos parámetros, se obtuvo un contenido fenólico de 19.5 ± 0.8 mg EAG g⁻¹ bs y una concentración de mangiferina de 1.50 ± 0.13 mg g⁻¹ bs. Los resultados obtenidos experimentalmente no difieren ($p < 0.05$) con los valores predichos por el modelo (19.37 mg EAG g⁻¹ bs y 1.22 mg g⁻¹ bs), confirmando que el modelo utilizado fue adecuado para predecir el TPC y concentración de mangiferina.

Con la finalidad de determinar la efectividad de la UAE, se realizó la extracción de los compuestos fenólicos con una técnica convencional (maceración sólido-líquido) desarrollado por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto,³⁶ método que permite extraer la mayor cantidad de compuestos antioxidantes de matrices vegetales. Sin embargo, con la limitante de utilizar solventes incompatibles con la industria alimentaria como son el metanol y la acetona. En este sentido, con el método tradicional y UAE para el TPC se encontraron los resultados de 22.1 ± 0.7 y 19.5 ± 0.8 mg GAE g⁻¹ bs, respectivamente. De igual manera, para mangiferina se encontró valores de 1.94 ± 0.22 y 1.50 ± 0.03 mg g⁻¹ bs para los métodos tradicionales y UAE, respectivamente. La ligera diferencia encontrada, se debe al potencial de la UAE, debido principalmente a la cavitación generada cuando una onda ultrasónica se propaga a través de un medio, causando ruptura celular y un aumento en la transferencia de masa.³⁷ Lo que le confiere a esta técnica obtener

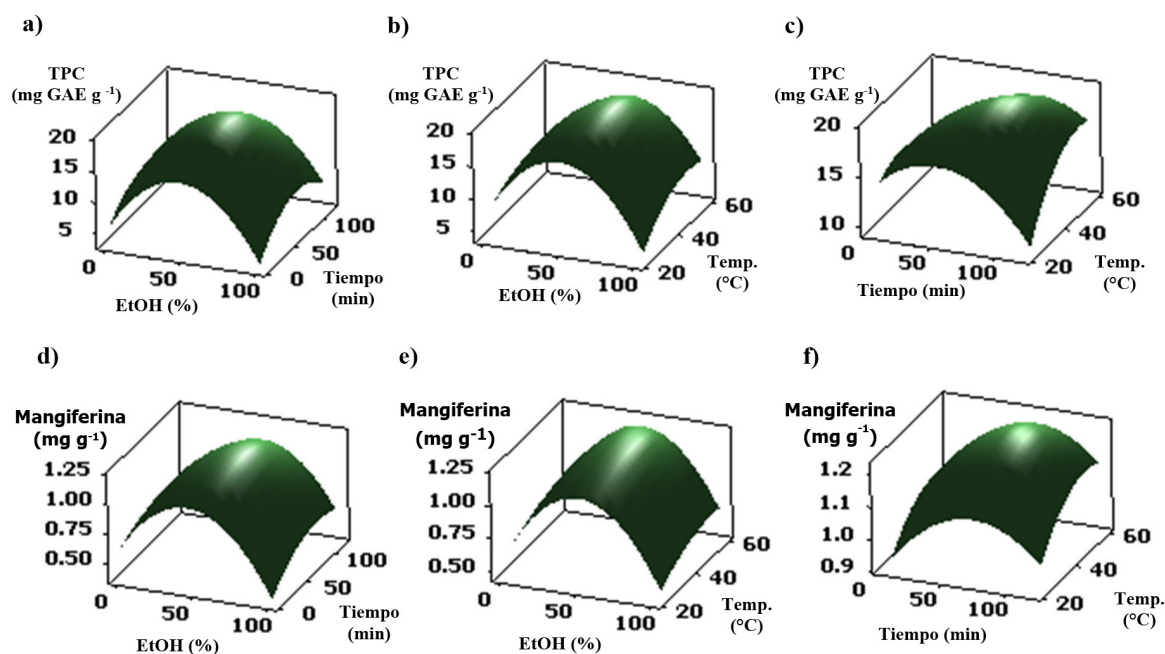


Figura 3. Gráfica 3D para la optimización del proceso de extracción: a) efecto de la concentración de etanol y tiempo de extracción sobre el TPC, b) efecto de la concentración de etanol y temperatura de extracción sobre el TPC, c) efecto del tiempo y temperatura de extracción sobre el TPC, d) efecto de la concentración de etanol y tiempo de extracción sobre el contenido de mangiferina, e) efecto de la concentración de etanol y temperatura de extracción sobre el contenido de mangiferina, f) efecto del tiempo y temperatura de extracción sobre el contenido de mangiferina

un extracto rico en compuestos fenólicos empleando únicamente solventes GRAS. Además, se observó una reducción en el tiempo de extracción cuando se utilizó ultrasonido (71 min), comparado con el tiempo utilizado en la maceración (120 min). Esto demuestra que la UAE es eficiente a la hora de extraer compuestos fenólicos presentes en la piel de mango y permite obtener excelentes resultados en tiempos cortos de extracción.

Identificación de compuestos fenólicos en piel de mango

La técnica analítica HPLC-ESI-IT-MSⁿ se utilizó para identificar los compuestos presentes en el extracto obtenido bajo las condiciones óptimas. En este sentido, un total de 38 compuestos se identificaron tentativamente en la piel de mango (Figura 4). Los tiempos de retención, fórmula molecular, m/z experimental, espectros de masas, rutas de fragmentación y la información reportada en la literatura, fueron indispensables para la identificación de compuestos, esta información se detalla en la Tabla 3. Los compuestos detectados permanecen a diversas familias como: ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, galatos y galatoninos, flavonoides, xantonas y derivados de la benzofenona.

Ácidos orgánicos

Cuatro ácidos orgánicos fueron identificados. El ácido málico (Tr = 1.42 min) exhibió un ion con m/z 133 y su espectro MS/MS mostró un fragmento a m/z 115 correspondiente [M-H-H₂O]⁻.³⁹ Además, se detectaron tres compuestos con ion m/z 191, los cuales fueron identificados tentativamente como ácido quínico, ácido cítrico y ácido isocítrico, en base a su orden de elución comparados con estudios previos.³⁹

Flavonoides

Respecto a la familia de los flavonoides, nuevos compuestos fueron identificados. En este sentido, el pico 42 (Tr = 23.79 min) presentó un ion con m/z de 301 y un fragmento principal a m/z 151 debido a una reacción inversa de Diels Alder (RDA). En base a esta información se identificó como quercetina.³⁹ Además, cinco derivados de la quercetina fueron detectados e identificados como quercetina-3-O-diglicósido (Tr = 15.18 min), quercetina-3-O-glucósido (Tr = 16.72 min), quercetina-3-O-galactósido (Tr = 17.02 min), pentosido de quercetina (Tr = 18.37 min) y quercetina-3-O-ramnosida

(Tr = 18.81 min). La identificación se realizó en base a los iones moleculares y el fragmento con m/z = 301 característico de la aglicona, que presentaron todos estos compuestos. Cabe indicar, que los isómeros pico 27 y 29, fueron identificados en base al orden de elución detallado por.⁴⁰ Por otra parte, los picos 38 y 39 se identificaron como Ramnetina-3-[6''-2 butenoi-hexósido] con un ion a m/z 545 y tiempos de retención de 19.15 y 19.51 min, respectivamente. El perfil de fragmentación mostró un ion a m/z 469, coincidiendo con la información reportada por Dorta *et al.*⁴⁰

Finalmente, el pico 41 (Tr = 23.07 min) exhibió un ion a m/z 477.65, y un fragmento a m/z = 315 correspondiente a la aglicona ramnetina. De acuerdo con la información reportada por Dorta *et al.*,⁴⁰ este compuesto se identificó tentativamente como ramnetina 3-O-hexósido.

Galatos y galatoninos

La evaluación del cromatograma (Figura 4) obtenido permitió identificar 11 compuestos pertenecientes a la familia de galatos y galatoninos. El pico 5 (Tr = 2.27 min) a m/z 331 y con fórmula molecular C₁₃H₁₆O₁₀ se identificó tentativamente como glucogalina. El modo MS/MS reflejó un fragmento común a m/z 169, causado por la presencia de una fracción de ácido gálico, producto de la pérdida de una molécula de glucosa.¹⁹ Así mismo, los picos 6 y 9, cuyos tiempos de retención fueron 2.89 y 5.53 min, respectivamente, presentaron un ion molecular y un espectro MS/MS similar al compuesto antes mencionado, por lo tanto, se consideraron isómeros de la glucogalina. Adicionalmente, el galato conocido como ácido gálico (pico 8) también fue detectado, gracias a su ion a m/z 169 y su fragmento característico (m/z 125) producido por la pérdida de una molécula de CO₂.⁴⁰ Además, el pico 8 se identificó como ácido 5-galoilquínico con un ion a m/z 343 y un tiempo de retención de 4.03 min. El perfil de fragmentación mostró un ion a m/z 169, seguido por otro a m/z 191, coincidiendo con la información reportada por López-Cobo *et al.*³⁸ Por otra parte, el galato de metilo (Tr = 9.24 min) exhibió un ion a m/z 183 y su espectro MS/MS mostró un fragmento a m/z 168, provocado por la pérdida de -CO₂CH₃.⁴⁰ Por otra parte, el pico 13 (Tr = 9.44 min), presentó un ion molecular a m/z 495 y un espectro MS/MS con fragmentos 191 y 343, fue identificado como ácido 3,5 digaloilquínico, en concordancia con el estudio de Clifford, Stoupi y Kuhnert.⁴²

Los picos 31 y 34, presentaron el mismo ion molecular a m/z 335 y fragmento MS/MS 183, correspondiente a un galato de metilo,

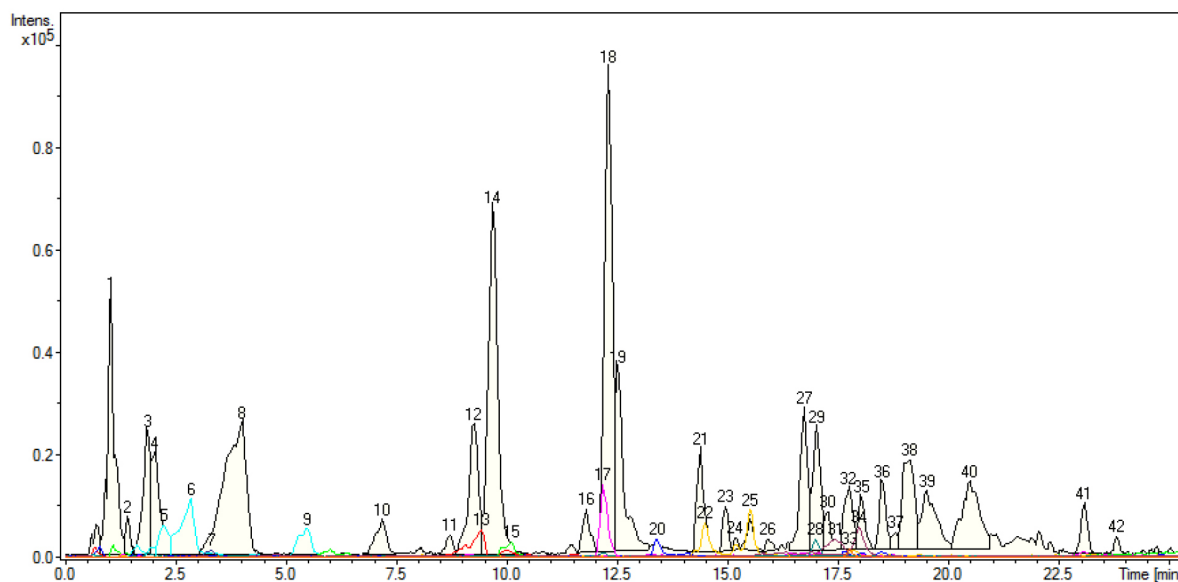


Figura 4. Cromatograma del extracto de piel de aguacate obtenido por HPLC-ESI-IT-MSⁿ

Tabla 3. Identificación de compuestos en el extracto de cáscara de mango por HPLC-ESI-IT-MS^a

#	Tr (min)	Formula molecular	m/z	Fragmentos MS/MS	Identificación tentativa	
1	1.06	C ₇ H ₁₂ O ₆	191	n.f.	Ácido quínico	*
2	1.42	C ₄ H ₆ O ₅	133	115	Ácido málico	◆
3	1.87	C ₆ H ₈ O ₇	191	111, 173	Ácido cítrico	◆
4	2.07	C ₆ H ₈ O ₇	191	111, 173	Ácido isocítrico	◆
5	2.27	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331	125, 169, 211, 241, 271	Glucogalina	●
6	2.89	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331	169, 211, 271	Glucogalina	●
7	3.33	C ₇ H ₆ O ₅	169	125	Ácido gálico	▲
8	4.03	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343	169, 191	Ácido galoilquínico	◆
9	5.53	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331	169	Glucogalina	●
10	7.20	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₁	423	303	Maclurin-3-C-β-D-glucósido	▲
11	8.72	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329	209, 239	Glucósido de ácido vanílico	*
12	9.24	C ₈ H ₈ O ₅	183	124	Galato de metilo	▲
13	9.44	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	495	191, 343	Ácido 3,5 digaloilquínico	*
14	9.68	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₅	575	303, 333, 405, 423	Maclurin-3-C-(2-O-galloil)-β-D-glucósido	▲
15	10.11	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325	163	Glucósido de ácido cumarico	*
16	11.80		553	385, 517		
17	12.21	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₄	559	287, 317, 389, 407	Iriflofenona 3-C-(2-O-galloil)-β-D-glucósido	▲
18	12.30	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	421	301, 331	Mangiferina	▲
19	12.49	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₉	727	557, 575	Maclurin-3-C-(2,3-di-O-galloil)-β-D-glucósido	▲
20	13.42	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	435	315, 345	Metoxi-mangiferina	*
21	14.40		543	285, 327, 405		
22	14.54	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₅	573	421	Galato de mangiferina	▲
23	14.95	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₈	711	389, 407, 541, 559	Iriflofenona 3-C-(2'',6''-di-O-galloil)-β-D-glucósido	▲
24	15.18	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595	301	Quercetina-3-O-diglicósido	●
25	15.52	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₅	573	421	Galato de mangiferina	▲
26	15.91	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787	n.f.	Tetragaloil-glucosa	▲
27	16.72	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463	301	Quercetina-3-O-glucósido	●
28	16.97	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₆	599	n.f.	Dímero de glucósido del ácido p-hidroxibenzoico	●
29	17.02	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463	301	Quercetina-3-O-galactósido	●
30	17.28		695	285, 327, 405, 557, 634		
31	17.43	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	335	183	Éster de galato de metilo	●
32	17.76	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	469	301	Dilactona del ácido valoneico	●
33	17.76	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939	n.f.	Pentagaloil-glucosa	▲
34	17.91	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	335	183	Éster de galato de metilo	●
35	18.37	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433	301	Pentosida de quercetina	▲
36	18.47	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	469	301	Dilactona del ácido valoneico	●
37	18.81	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447	301	Quercetina-3-O-ramnosida (quercitrina)	●
38	19.15	C ₂₆ H ₁₆ O ₁₃	545	469	Ramnetina-3-[6''-2 butenoil-hexósido]	●
39	19.51	C ₂₆ H ₁₆ O ₁₃	545	469	Ramnetina-3-[6''-2 butenoil-hexósido]	●
40	20.49		621	469, 545		
41	23.21	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477	315	Ramnetina 3-O-hexósido	●
42	23.79	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301	151, 179	Quercetina	◆

Fuente: * López-Cobo *et al.*,³⁸ ◆ Figueroa *et al.*,³⁹ ● Dorta *et al.*,⁴⁰ ▲ Barreto *et al.*⁴¹

fueron identificados como isómeros del éster de galato de metilo.⁴⁰ Finalmente, los picos 26 y 33, fueron identificados como tetragaloil-glucosa y pentagaloil-glucosa, en función a los iones moleculares detectados. Estos compuestos fueron previamente reportados por Dorta *et al.*,⁴⁰ y López-Cobo *et al.*³⁸

Derivados de la benzofenona

Un total de 5 derivados de la benzofenona fueron detectados por la metodología utilizada en el presente estudio. El pico 10 (Tr = 7.10 min) presentaron un ion a m/z 423, mientras que su patrón de fragmentación reflejó un ion a m/z 303 provocado por la escisión del

C-glucósido,⁴¹ fue identificado como Maclurin-3-C-β-D-glucósido.

Por otro lado, los picos 14, 17, 19 y 23 con iones moleculares de 575, 559, 727 y 711, respectivamente. Todos presentaron en sus espectros MS/MS fragmentos por la pérdida de 152 Da y 170 Da, indicando la presencia de un grupo galoil y ácido gálico. Además, se presentaron los fragmentos 333, 317, 485 y 469, respectivamente, debido a escisión del C-glucósido (90 Da) y eliminación de grupo galoil (152 Da). En base a esta información los picos fueron identificados como maclurin-3-C-(2-O-galloil)-β-D-glucósido, iriflofenona 3-C-(2-O-galloil)-β-D-glucósido, maclurin-3-C-(2,3-di-O-galloil)-β-D-glucósido y iriflofenona 3-C-(2'',6''-di-O-galloil)-β-D-glucósido, respectivamente.

Xantonas y sus derivados

En la actualidad, los compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de las xantonas juegan un papel indispensable en la industria alimentaria, pues gracias a sus poderosas propiedades las convierte en un antioxidante más potente que la vitamina C y la vitamina E.^{1,40}

Los picos 18 (Tr = 12.30 min) y 20 (Tr = 13.42 min) con fórmulas C₁₉H₁₈O₁₁ y C₂₀H₂₀O₁₁ con iones a m/z 421 y 435. Presentaron un patrón fragmentación similar (M – H – 120 Da) y (M – H – 90 Da), derivados de la escisión del C-glucósido.⁴¹ Este patrón de fragmentación corresponde a los compuestos mangiferina y metoxi-mangiferina, respectivamente.

Por otro lado, los picos 22 y 25 exhibieron un ion molecular a m/z 573 y un fragmento predominante a m/z 421 debido a eliminación de grupo galoil (152 Da). Por lo tanto, estos compuestos fueron identificados como isómeros del galato de mangiferina. La presencia de estos compuestos coincidieron con la información reportada por Barreto *et al.*,⁴¹ Dorta *et al.*,⁴⁰ y Gómez-Caravaca *et al.*¹⁹

Otros compuestos polares

Adicionalmente, el análisis cromatográfico reveló la presencia de compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. En este sentido, el pico 11 (Tr = 8.72 min) se identificó como glucósido de ácido vanílico, con un espectro MS/MS con fragmentos a m/z 209 (M – H – 120 Da) y 239 (M – H – 90 Da), derivados de la escisión del C-glucósido. El pico 15 (Tr = 10.11 min) con ion molecular a m/z 325 y fragmento a m/z 163, producto de la pérdida de una molécula de glucosa, fue identificado como glucósido de ácido cumárico. Por otra parte, el pico 28 fue identificado como dímero de glucósido del ácido p-hidroxibenzoico en función a su m/z 559, coincidiendo con la información reportada por Gómez-Caravaca *et al.*¹⁹

Finalmente, dos compuestos derivados del ácido elágico se detectaron. Los picos 32 y 36, ambos con ion molecular 469 y fragmento a 301, fueron identificados como isómeros dilactona del ácido valoneico.⁴⁰

CONCLUSIONES

Los procesos de deshidratación y de extracción de compuestos fenólicos en piel de mango fueron optimizados de manera exitosa mediante la metodología de superficie de respuesta. Para el proceso de deshidratación, las condiciones óptimas fueron 54 °C y 2.3 kg m⁻². Bajo estos parámetros se obtuvo un TPC de 21.7 ± 1.6 mg EAG g⁻¹ bs y, una concentración de mangiferina de 1.94 ± 0.22 mg g⁻¹ bs. Por otro lado, las condiciones óptimas para la UAE fueron 50% EtOH, 71 min y 51 °C, con estas condiciones se encontró un TPC 19.5 ± 0.8 mg EAG g⁻¹ bs y un contenido de mangiferina de 1.50 ± 0.13 mg g⁻¹ bs. Finalmente, en el extracto obtenido con las condiciones óptimas, se logró identificar 38 compuestos mediante la técnica de HPLC-ESI-IT-MSⁿ.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Los datos del ANOVA están disponibles en <http://quimicanova.sbq.org.br>, en formato pdf, con acceso gratuito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) por la financiación del estudio. Agradecen también a los revisores pares y a los editores de esta revista por sus comentarios, que ayudaron a mejorar este trabajo.

REFERENCIAS

- Martin, M.; He, Q.; *Food Rev. Int.* **2009**, *25*, 346.
- Singh, Z.; Singh, R. K.; Sane, V. A.; Nath, P.; *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **2013**, *32*, 217.
- Kim, H.; Moon, J. Y.; Kim, H.; Lee, D.-S.; Cho, M.; Choi, H.-K.; Kim, Y. S.; Mosaddik, A.; Cho, S. K.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 429.
- Dorta, E.; Lobo, M. G.; González, M.; *J. Food Sci.* **2012**, *77*, 80.
- Sogi, D. S.; Siddiq, M.; Greiby, I.; Dolan, K. D.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 2649.
- Sogi, D. S.; Siddiq, M.; Roidoung, S.; Dolan, K. D.; *J. Food Sci.* **2012**, *77*, 1197.
- Figueroa, J. G.; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Quirantes-Piné, R.; Segura-Carretero, A.; *Electrophoresis* **2018**, *39*, 1908.
- Tiwari, B. K.; *Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 100.
- Şahin, S.; Aybastier, Ö.; Işik, E.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 1361.
- Liu, Y.; Wei, S.; Liao, M.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 837.
- Bashi, D.; Mortazavi, S. A.; Rezaei, K.; Rajaei, A.; Karimkhani, M. M.; *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 1005.
- Sun, Y.; Liu, J.; Kennedy, J. F.; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 949.
- Mendoza, R.; Herrera, A. O.; *Inf. Tecnol.* **2012**, *23*, 73.
- Horwitz, W.; *Official Methods of Analysis of AOAC International*; 16th ed.; AOAC International: Washington, 2010.
- Nasirizadeh, N.; Dehghanizadeh, H.; Yazdanshenas, M. E.; Moghadam, M. R.; Karimi, A.; *Ind. Crops Prod.* **2012**, *40*, 361.
- Armijos, M. A.; Figueroa, J. G.; *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* **2012**, *3*, 202.
- Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5036.
- Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escalera, L. A.; *Talanta* **2008**, *76*, 965.
- Gómez-Caravaca, A. M.; López-Cobo, A.; Verardo, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1072.
- Dong, X.; Hu, Y.; Li, Y.; Zhou, Z.; *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2019**, *243*, 281.
- Oliveira, B. G.; Costa, H. B.; Ventura, J. A.; Kondratyuk, T. P.; Barroso, M. E. S.; Correia, R. M.; Pimentel, E. F.; Pinto, F. E.; Endringer, D. C.; Romão, W.; *Food Chem.* **2016**, *204*, 37.
- Saavedra, J.; Córdova, A.; Navarro, R.; Díaz-Calderón, P.; Fuentealba, C.; Astudillo-Castro, C.; Toledo, L.; Enrione, J.; Galvez, L.; *J. Food Eng.* **2017**, *198*, 81.
- Lang, G. H.; Lindemann, I. da S.; Ferreira, C. D.; Hoffmann, J. F.; Vanier, N. L.; de Oliveira, M.; *Food Chem.* **2019**, *287*, 197.
- Gümüşay, Ö. A.; Borazan, A. A.; Ercal, N.; Demirkol, O.; *Food Chem.* **2015**, *173*, 156.
- Miranda, M.; Vega-Gálvez, A.; López, J.; Parada, G.; Sanders, M.; Aranda, M.; Uribe, E.; Di Scala, K.; *Ind. Crops Prod.* **2010**, *32*, 258.
- Berardini, N.; Knödler, M.; Schieber, A.; Carle, R.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2005**, *6*, 442.
- Valadez-Carmona, L.; Plazola-Jacinto, C. P.; Hernández-Ortega, M.; Hernández-Navarro, M. D.; Villarreal, F.; Necochea-Mondragón, H.;

- Ortiz-Moreno, A.; Ceballos-Reyes, G.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2017**, *41*, 378.
28. de Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Zacarías, L.; Rodrigo, M. J.; Sáyago Ayerdí, S.; Blancas Benítez, F. J.; Domínguez Avila, J. A.; González-Aguilar, G. A.; *J. Food Meas. Charact.* **2018**, *12*, 2145.
29. Tello-Ireland, C.; Lemus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; López, J.; Di Scala, K.; *LWT – Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 2112.
30. Amin, I.; Norazaidah, Y.; Hainida, K. I. E.; *Food Chem.* **2006**, *94*, 47.
31. Ochocka, R.; Hering, A.; Stefanowicz-Hajduk, J.; Cal, K.; Barańska, H.; *PLoS One* **2017**, *12*, 1.
32. Chen, M.; Zhao, Y.; Yu, S.; *Food Chem.* **2014**, *172*, 543.
33. Tomšik, A.; Pavlič, B.; Vladić, J.; Ramić, M.; Brindza, J.; Vidović, S.; *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *29*, 502.
34. Ghafoor, K.; Choi, Y. H.; *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2009**, *52*, 295.
35. Aybastier, Ö.; Işik, E.; Şahin, S.; Demir, C.; *Ind. Crops Prod.* **2013**, *44*, 558.
36. Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones 2007*, 1150.
37. Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y.; Li, X.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 804.
38. López-Cobo, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Pasini, F.; Caboni, M. F.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; *LWT – Food Sci. Technol.* **2016**, *73*, 505.
39. Figueroa, J. G.; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Segura-Carretero, A.; *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 752.
40. Dorta, E.; González, M.; Lobo, M. G.; Sánchez-Moreno, C.; de Ancos, B.; *Food Res. Int.* **2014**, *57*, 51.
41. Barreto, J.; Trevisan, M. T. .; Hull, W.; Erben, G.; de Brito, E.; Pfundstein, B.; Würtele, G.; Spiegelhalter, B.; Owen, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5599.
42. Clifford, M. N.; Stoupi, S.; Kuhnert, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2797.