

# **ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

## **FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA**

### **EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ENZIMAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE CÁSCARA DE MANGO *Mangifera* *indica* var. Tommy Atkins**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGÍSTER EN  
BIOCIENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN BIODESCUBRIMIENTO**

**ANAHÍ BELÉN BONILLA RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR: ING. JENNY CUMANDÁ RUALES NÁJERA, Ph.D**

**CO-DIRECTOR: ING. DAVID ENRIQUE VANEGAS JÁCOME, M.Sc.**

**Quito, septiembre 2021**

© Escuela Politécnica Nacional 2021  
Reservados todos los derechos de reproducción

## **DECLARACIÓN**

Yo Anahí Belén Bonilla Rodríguez, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.



---

Anahí Belén Bonilla Rodríguez

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Anahí Belén Bonilla Rodríguez, bajo mi supervisión.



Firmado electrónicamente por:

**JENY  
CUMANDA  
RUALES  
NAJERA**

---

Ing. Jenny Ruales, Ph.D  
**DIRECTOR DE PROYECTO**



Firmado electrónicamente por:

**DAVID ENRIQUE  
VANEGAS JACOME**

---

Ing. David Vanegas, Ms.C  
**CODIRECTOR DE PROYECTO**

## **AUSPICIO**

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto TEAM2017PR442-75644 VLIR-UOS, que se ejecuta en el Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional.

## Extracción Asistida por Enzimas de Compuestos Fenólicos a Partir de Cáscara de Mango *Mangifera indica* var. Tommy Atkins

**Resumen:** La extracción convencional de compuestos bioactivos presenta bajos rendimientos, esto ha motivado el desarrollo de métodos más eficientes. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de enzimas en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de mango *Mangifera indica* var. Tommy Atkins. En este trabajo se muestra el efecto de parámetros de extracción en el contenido fenólico total (CFT). La aplicación de pectinasa y celulasa:pectinasa (1:1, m/m) incrementó el CFT en un 53 % y 46 %, respectivamente. Los factores temperatura y tiempo fueron significativos ( $p < 0,05$ ) en la extracción asistida por pectinasa, así como las interacciones entre la temperatura y tiempo, y entre temperatura y pH. En el perfil de compuestos fenólicos, se observó un contenido significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) de ácido gálico al aplicar la extracción asistida por pectinasa. En cuanto a las propiedades antioxidantes, el uso de pectinasa en el proceso de extracción incrementó aproximadamente un 70 % en la capacidad antioxidante *in vitro* determinada mediante ensayo ABTS. No se observó actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados sugieren que la EAE permite obtener extractos con aplicabilidad para la industria, principalmente como antioxidantes.

**Palabras clave:** cáscara de mango, extracción asistida por enzimas, compuestos fenólicos

## Enzymatic Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mango Peel *Mangifera indica* var. Tommy Atkins

**Abstract:** The conventional extraction of bioactive compounds shows low yields, this has motivated the development of more efficient methods. The objective of this investigation was to evaluate the use of enzymes in the extraction of phenolic compounds from mango peel *Mangifera indica* var. Tommy Atkins. This article describes the effect of extraction parameters on the total phenolic content (TPC). The application of pectinase and cellulase: pectinase (1:1, m/m) increased the CFT by 53 % and 46 %, respectively. The factors temperature and time were significant ( $p < 0,05$ ) in the pectinase-assisted extraction, as well as the interaction of temperature and time and temperature and pH. In the profile of phenolic compounds, a significantly higher content ( $p < 0,05$ ) of gallic acid was observed when we applied pectinase-assisted extraction. Regarding the bioactive properties, the use of pectinase in the extraction process increased approximately 70 % the *in vitro* antioxidant capacity determined by ABTS assay. No antimicrobial activity was observed against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results suggest that EAE makes it possible to obtain extracts with applicability for industry, mainly as antioxidants.

**Key words:** mango peel, enzymatic assisted extraction, phenolic compounds

### 1. INTRODUCCIÓN

Los residuos desechados por agroindustrias pueden ser valorizados a través de la extracción de fitocompuestos. Uno de los residuos agroindustriales con mayor potencial como fuente de compuestos con actividad biológica es la cáscara de mango, que se destaca por su elevado contenido fenólico, incluso entre 10 y 85 veces superior al cuantificado en semilla y pulpa, respectivamente (Ruales et al., 2018). La mangiferina es el compuesto de tipo fenólico predominante en cáscara de mango, principalmente en la variedad Tommy Atkins (Marcillo-Parra et al., 2021). Estos compuestos presentes en cáscara de mango puede ser aplicables en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (Huang et al., 2018).

La extracción de compuestos de tipo fenólico mediante métodos convencionales como maceración, hidrodestilación y Soxhlet requiere tiempos prolongados de extracción, y altas temperaturas, que ocasionan la descomposición de compuestos termolábiles y pérdida de la actividad antioxidante (Gligor et al., 2019; Soto-Maldonado y Zúñiga-Hansen, 2017). Los bajos rendimientos de extracción es otro inconveniente común entre los métodos convencionales (Nadar et al., 2018).

La tendencia actual es la aplicación de métodos alternativos que permitan superar los inconvenientes de la extracción convencional. Para extraer compuestos de tipo fenólico a partir de cáscara de mango se han aplicado métodos alternativos como extracción asistida por microondas, ultrasonido y extracción supercrítica (Dorta et al., 2014; Garcia-Mendoza et al., 2015; Safdar et al., 2017). A pesar de que estos métodos han logrado incrementar los rendimientos de extracción, un gran contenido de compuestos fenólicos ligados no son

extraídos por estos procesos (Pérez-Jiménez y Torres, 2011). El contenido de compuestos fenólicos ligados en cáscara de mango es alto (hasta 29,52 mg/g) (Ajila y Prasada Rao, 2013). Considerando esto, es necesaria la aplicación de una metodología que libere compuestos fenólicos ligados, mejore los rendimientos de extracción y mantenga las propiedades bioactivas de los extractos.

La extracción asistida por enzimas (EAE) es un método eficiente utilizado para extraer compuestos bioactivos mediante el uso de enzimas hidrolíticas que degradan las paredes celulares (Puri et al., 2012). También, estas enzimas liberan compuestos ligados al hidrolizar sus enlaces glicosídicos con compuestos estructurales de la pared celular (Yadav et al., 2013).

Las principales ventajas de aplicar EAE son menor tiempo de extracción, mayor rendimiento y menor uso de solventes orgánicos tóxicos (Marathe et al., 2019). Además, las condiciones de operación de este proceso no afectan la capacidad antioxidante de compuestos extraídos (Soto-Maldonado y Zúñiga-Hansen, 2017).

La EAE ya ha logrado mejorar la extracción de compuestos fenólicos en otros residuos agroindustriales provenientes de frambuesa (Laroze et al., 2010), granada (Mushtaq et al., 2015), uva (Gómez-García et al., 2012) y cereza (Domínguez-Rodríguez et al., 2021). También, estas investigaciones han observado que el tipo de enzima, concentración enzimática, pH, tiempo y temperatura de incubación, influyen en la liberación de compuestos. No existe información bibliográfica sobre la aplicación de EAE en residuos de mango.

Teniendo esto en cuenta, el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el uso de enzimas en la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de mango *Mangifera indica* var. Tommy Atkins.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Muestra

Se usaron mangos Tommy Atkins cultivados en una finca de la provincia de Imbabura - Ecuador, (0°27'06,4"N 77°59'22,6"W), adquiridos localmente en febrero de 2019. De acuerdo a la gravedad específica de los frutos, se seleccionaron aquellos considerados como maduros (densidad > 1 g.cm<sup>-3</sup>) (Runpichayapichet et al., 2015). A éstos se realizó un proceso de lavado con agua potable y desinfección con hipoclorito de sodio (50 ppm). La cáscara se separó de la pulpa utilizando un cuchillo de acero inoxidable. La piel separada se cortó en pedazos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se liofilizó en un liofilizador (LabFreez FD-100F-R Pilot Freeze Dryer, Hunan, China). Las cáscaras liofilizadas se trituraron en un molino de granos (Corona-Universal, Bogotá, Colombia) y se tamizaron empleando un tamiz (número de malla 40). Las partículas obtenidas tuvieron un tamaño menor a 0,42 mm. Para obtener el contenido de humedad de la muestra se aplicó un método gravimétrico (AOAC, 2005). Finalmente, las muestras se empacaron en fundas aluminizadas y se almacenaron a -20 °C

en un congelador (Thermo Scientific Revco Ult 1 340, Ashville, Estados Unidos).

### 2.2 Reactivos, estándares y enzimas

El reactivo Folin-Ciocalteu y los solventes etanol, metanol, dimetil sulfóxido (DMSO) y acetonitrilo grado HPLC se compraron de Merck (Darmstadt, Alemania). Los reactivos carbonato de sodio, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) diamonio (ABTS), fluoresceína sódica, ácido (R)-(+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), persulfato de potasio y 2,20-azo-bis(2-amidinopropano diclorhidrato) (AAPH); y los estándares (+)-catequina, ácido gálico, (-)-epicatequina, mangiferina, quercetina y rutina hidrato se compraron a un distribuidor local de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). Los medios de cultivo Agar tripteína soya (TSA) y caldo tripteína soya (TSB) se compraron de Difco (Detroit, Estados Unidos) y TM media (Delhi, India), respectivamente.

Las enzimas comerciales: pectinasa (P4716) con actividad enzimática ≥ 5 unidades/mg proteína y celulasa (C1184) con actividad enzimática > 0,30 unidades/mg sólido se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Para las extracciones enzimáticas se utilizaron tres soluciones: Buffer acetato 50 mM (pH 5), preparado con acetato de sodio y ácido acético de Merck (Darmstadt, Alemania); y soluciones Buffer citrato 50 mM de pH 3 y pH 5, preparadas con citrato de sodio de J.T. Baker (Dagenham, Inglaterra) y ácido cítrico de Merck (Darmstadt, Alemania).

### 2.3 Selección de la enzima

Se aplicó un primer experimento para seleccionar la enzima que maximice el CFT de los extractos. Se aplicaron tres tratamientos enzimáticos: pectinasa, celulasa y una combinación de celulasa y pectinasa (1:1, m/m). Además, se preparó un control bajo las mismas condiciones, sin la adición de tratamiento enzimático. Cada extracción se realizó por triplicado y se determinó el CFT.

Se colocaron 0,50 g de cáscara de mango liofilizada en una botella de vidrio ámbar, luego se añadieron 25 mL de solución de la respectiva enzima en Buffer citrato pH 4, siendo 5 % E/S la concentración final. La mezcla se mantuvo a una temperatura de 30 °C por 180 min en un baño termostático (Precision Scientific 66 800 modelo 25, Chicago, Estados Unidos) con agitación constante a 150 rpm. Luego, se detuvo la reacción enzimática enfriando la mezcla en un baño con hielo durante 10 min y se centrifugó a 2 512 × g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se filtró la suspensión usando papel Whatmann 1 y se recogió el sobrenadante. Después, 25 mL de solución etanol:agua (1:1, v/v) se añadieron al residuo y se sometió a una nueva extracción en un baño Ultrasónico (Branson 3 210, Danbury, Estados Unidos), con una frecuencia de 40 Hz. Después de 15 min de extracción, la suspensión se centrifugó y se filtró bajo las condiciones previamente mencionadas. Finalmente, los dos sobrenadantes se unieron. El extracto final obtenido a partir de los dos sobrenadantes se almacenó a 4 °C para su posterior análisis.

## 2.4 Determinación del contenido fenólico total

El ensayo de Folin-Ciocalteu empleado para cuantificar el CFT de los extractos se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Georgé et al. (2005). A un volumen de 0,50 mL de extracto diluido, estándar o blanco se añadieron 2,50 mL de una solución del reactivo Folin-Ciocalteu:agua (1:10, v/v). Después de 2 min, se agregó una solución de carbonato de sodio (2 mL), de concentración 75 g/L. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 50 °C por 15 minutos manteniendo la mezcla en un baño termostático (Precision Scientific 66 800 modelo 25, Chicago, Estados Unidos). Se construyó una curva de calibración con un estándar de ácido gálico. Los resultados se presentaron como mg equivalentes de ácido gálico/g en base seca de cáscara de mango (mg EAG/g base seca).

## 2.5 Experimento de diseño factorial

Luego de seleccionar la enzima que incrementó el CFT de los extractos, se aplicó un diseño factorial  $2^4$  con 4 repeticiones en el punto central para evaluar los factores que afectan significativamente el CFT de los extractos. El diseño fue sugerido por el software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Los factores que se evaluaron fueron tiempo de incubación, temperatura, % E/S y pH. Para cada factor, el rango experimental se basó en condiciones de operación reportadas por la ficha técnica de las enzimas y datos reportados en la literatura para otros sustratos (Chamorro et al., 2012; Fernández et al., 2015; Goodger et al., 2016; Lotfi et al., 2015; Mushtaq et al., 2015). El diseño completo que constó de 20 puntos experimentales se muestra en la Tabla 1. Los experimentos se realizaron en orden aleatorio para minimizar los efectos de los factores no controlados. La variable de respuesta fue el CFT, expresada como la media de tres determinaciones independientes. La extracción se realizó según el proceso detallado en 2.3.

## 2.6 Perfil de compuestos fenólicos por UPLC-PDA

Los extractos fueron purificados mediante extracción en fase sólida. Se cargaron lentamente 4 mL de extracto en una columna Oasis HLB de 3 mL de volumen, 60 mg de peso de sorbente y 30  $\mu$ m de tamaño de partícula (Waters, Milford, MA, Estado Unidos) previamente acondicionada con 3 mL de metanol y 3 mL de agua desionizada. Los azúcares fueron removidos con 2 mL de agua desionizada. Luego, los compuestos que quedaron unidos a la superficie del adsorbente se eluyeron con 4 mL de una solución de metanol:ácido fórmico (99:1, v/v). El eluyente obtenido se evaporó bajo flujo de nitrógeno a 35 °C. Para el análisis, el residuo seco de la muestra se redisolvió en 1 mL de agua:ácido fórmico (1 000:1, v/v). Para lograr la completa disolución, las muestras fueron agitadas con un vórtex por 1 min y sometidas a sonicación en un baño Ultrasónico (Branson 3210, Danbury, Estados Unidos) por 5 min. Finalmente, los extractos se pasaron a través de un filtro de PVDF para jeringa, de tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y se mantuvieron a una temperatura de -20 °C hasta el análisis por UPLC-PDA.

Los perfiles cromatográficos de los compuestos fenólicos extraídos por EAE se analizaron utilizando un sistema Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (Waters, Milford, MA, Estados Unidos). Se usó una columna Acquity UPLC High Strength Silica (HSS) T3 (2,1 mm×100 mm; 1,8  $\mu$ m; 100 Å) a una temperatura de 40 °C, bajo las condiciones descritas por Marcillo-Parra et al. (2021). Los datos espectrales UV-Vis se registraron en un rango de 210 a 600 nm. El sistema UPLC fue controlado por el software Empower 3 (Waters, Reino Unido). Para la identificación de compuestos, los tiempos de retención y espectros UV-Vis de los picos del cromatograma se compararon con aquellos de los estándares de mangiferina, ácido gálico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina y rutina. La cuantificación se realizó utilizando curvas de calibración de los respectivos estándares.

## 2.7 Capacidad antioxidante in vitro

### 2.7.1 Ensayo ABTS<sup>+</sup>

Se usó el método detallado por Re et al. (1999) para aplicar el ensayo ABTS<sup>+</sup>. Se hicieron reaccionar 10  $\mu$ L de extracto diluido, estándar o blanco con 1 mL de solución del catión ABTS (ABTS<sup>+</sup>) previamente preparada. Los cambios en la absorbancia producidos por la reacción se midieron a 734 nm, se realizaron mediciones cada 60 s por 6 min. Se utilizó etanol como blanco. Los resultados se expresaron como  $\mu$ M equivalentes de Trolox/100 g en base seca de cáscara de mango ( $\mu$ M ET/100 g base seca).

**Tabla 1.** Diseño factorial  $2^4$  con respuesta observada

Ensayo	Variables independientes				Variable de respuesta
	Tiempo	Temperatura	pH	E/S	CFT*
1	180	40	3	2	35,61
2	60	40	5	10	28,39
3	180	20	3	2	26,30
4	60	20	3	10	35,45
5	120	30	4	6	34,16
6	180	40	3	10	44,29
7	60	20	5	10	31,61
8	60	40	3	10	36,11
9	180	20	5	2	27,11
10	120	30	4	6	34,53
11	60	20	3	2	29,53
12	60	40	5	2	31,75
13	180	40	5	2	31,92
14	60	20	5	2	32,28
15	180	20	5	10	30,74
16	180	20	3	10	26,76
17	60	40	3	2	32,96
18	180	40	5	10	32,69
19	120	30	4	6	34,49
20	120	30	4	6	33,91

\*CFT expresado como mg GAE/g base seca (n=3)



### 2.7.2 Ensayo ORAC

De acuerdo al método usado por Dávalos et al. (2004) se realizó lo siguiente, se agregaron por triplicado 20  $\mu\text{L}$  del extracto diluido, estándar o blanco en una microplaca de 96 pocillos, acto seguido se adicionó una solución de fluoresceína de concentración 1 140 mM (120  $\mu\text{L}$ ) y una solución de AAPH de concentración 0,40 mM (60  $\mu\text{L}$ ). Una solución Buffer de fosfato de potasio se usó como blanco, y se usaron soluciones de Trolox de concentración 25, 50, 100, 300, 500, 800, 1 000 y 1 500  $\mu\text{M}$  para la curva de calibración. La fluorescencia se controló cada 60 s por 80 min en un equipo de lectura de placas (FLUOstar Omega, Offenburg, Alemania), usando los filtros de longitud de onda de 485 nm para excitación y 520 nm para emisión. Se construyó una curva para determinar la pérdida de fluorescencia con respecto al tiempo y se determinó el área bajo la curva (ABC) para el blanco, muestra y estándares. Finalmente, se obtuvieron las diferencias entre el ABC del blanco y la muestra/estándar. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox/100 g en base seca de cáscara de mango ( $\mu\text{M ET}/100 \text{ g base seca}$ ).

## 2.8 Actividad antimicrobiana

### 2.8.1 Extractos

En este ensayo se utilizaron extractos liofilizados. Para esto, los extractos hidroalcohólicos obtenidos como se describe en 2.3 fueron concentrados al vacío en un rotavapor (Buchi EL 131, Essen, Alemania) por 20 min a 40 °C. Luego, se liofilizaron (Lyovac GT2, Frenkendorf, Suiza), y se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis.

### 2.8.2 Microorganismos

En este estudio se usaron dos cepas bacterianas liofilizadas Kwik-Stik™ de Microbiologics: *Staphylococcus aureus* con código de referencia ATCC 25923 y *Escherichia coli* con código de referencia ATCC 25922. Los microorganismos fueron activados en agar TSA mediante incubación a 37 °C por 24 horas. Para la preparación y estandarización del inóculo, se tomaron 2 colonias aisladas y se suspendieron en 4 mL del caldo TSB y se incubaron hasta alcanzar una concentración de  $1\text{E}+08$  UFC/mL. Esta suspensión se diluyó con caldo TSA hasta obtener una concentración de  $1\text{E}+06$  UFC/mL (CLSI, 2015).

### 2.8.3 Concentración mínima inhibitoria

Para determinar la capacidad de los extractos para inhibir el crecimiento bacteriano se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando un método de microdilución en caldo de la guía M07-A10 del Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorio (CLSI, 2015).

Se preparó una solución madre de concentración 5 000  $\mu\text{g/mL}$  diluyendo los extractos liofilizados en caldo TSB con DMSO al 1 %. Esta solución madre se utilizó para preparar diluciones seriadas dobles (100  $\mu\text{L}$ ) en una microplaca estéril de 96 pocillos. Luego, a todas las diluciones se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo estandarizado a una concentración de  $1\text{E}+06$  UFC/mL

para alcanzar una concentración final de  $5\text{E}+05$  UFC en cada pocillo. Las concentraciones finales de extractos en los pocillos fueron desde 2 500 hasta 19,53  $\mu\text{g/mL}$ . Se incluyeron en el ensayo controles de esterilidad y crecimiento. Se utilizó ampicilina (Genfar, Colombia) como antibiótico de referencia a concentraciones de 62,50 a 0,49  $\mu\text{g/mL}$ . Las microplacas se incubaron durante 24 h a 37 °C. La densidad óptica se midió en un lector de microplacas (BioTek Sinergy H2, Winooski, VT, USA) a 600 nm. La concentración más baja del extracto que produjo una inhibición del crecimiento del 90 % o más se consideró como la CMI.

### 2.8.4 Concentración mínima bactericida

De cada dilución de extracto que inhibió el crecimiento de organismos bacterianos se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron en TSA. Estas placas se colocaron en la incubadora por 24 h a una temperatura de 37 °C. La concentración más baja sin crecimiento visible se definió como la concentración mínima bactericida (CMB) (Cendrowski et al., 2020).

## 2.9 Análisis estadístico

Para analizar los datos generados por el experimento se utilizó el software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. El análisis de varianza multifactorial (ANOVA) se usó para analizar el efecto de los parámetros de extracción y sus interacciones. Cuando los parámetros presentaban un  $p < 0,05$ , se consideraron que influían significativamente en el CFT. Todos los demás datos se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ), cuando correspondía.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Selección de la enzima

El CFT de los extractos obtenidos mediante la EAE con enzimas pectinasa, celulasa y celulasa:pectinasa (1;1, m/m) se muestra en la Tabla 2. El CFT de los extractos varió entre  $27,23 \pm 2,17$  y  $41,65 \pm 0,57$  mg GAE/g base seca. Estos valores son comparables con estudios previos que reportan un contenido fenólico desde 29,31 hasta 41,46 mg GAE/g base seca de cáscara de mango Tommy Atkins (Marcillo-Parra et al., 2021). Se evidenciaron incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) en el CFT al adicionar enzimas en la extracción, en comparación con el control obtenido sin la aplicación de enzima. Los valores más altos de CFT se obtuvieron al usar pectinasa y celulasa:pectinasa (1:1, m/m). Estos incrementos fueron del 53 % y 46 %, respectivamente, en comparación con el control.

**Tabla 2.** Influencia del tipo de enzima en el CFT

Enzima	CFT*
Pectinasa	$41,65 \pm 0,57_a$
Celulasa	$34,62 \pm 1,57_b$
Celulasa:pectinasa	$39,76 \pm 1,59_a$
Control	$27,23 \pm 2,17_c$

\*CFT expresado como mg GAE/g base seca. Los valores medios con letra diferente son diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (n = 3)

La aplicación de enzimas en procesos de extracción a partir de otras matrices ha logrado incrementos similares en la liberación de compuestos fenólicos, según datos reportados por otros investigadores. Gómez-García et al. (2012) lograron incrementar en un 25 % el CFT de extractos obtenidos mediante la extracción con una enzima comercial, a partir de residuos agroindustriales de uva. Un mayor incremento en el CFT (42 %) de extractos obtenidos a partir de cáscara de *Dimocarpus longan* fue observado por Rakariyatham et al. (2020) al aplicar tratamientos enzimáticos para extraer compuestos de tipo fenólico.

Si bien con la aplicación de celulasa también se observó un incremento significativo del 27 % en el CFT respecto al control, este contenido fue menor comparado con los otros tratamientos enzimáticos. Esto podría ser atribuido a la presencia de lignina en la pared celular, ya que la misma puede inhibir la acción hidrolítica de esta enzima mediante adsorción no productiva (Saini et al., 2016).

Varios autores han observado que el uso combinado de enzimas en la EAE puede incrementar la liberación de compuestos fenólicos (Mushtaq et al., 2015; Wang et al., 2017). Sin embargo, en esta investigación no se evidenció diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos con pectinasa sola y celulasa:pectinasa. Esto podría atribuirse al hecho de que la enzima comercial pectinasa es una preparación enzimática que también contiene pequeñas cantidades de celulasa y hemicelulasa, según lo reportado por los fabricantes (Sigma Aldrich, 2021).

Con base en esto y con el objetivo de optimizar recursos, se seleccionó el tratamiento con pectinasa sola para los siguientes ensayos.

### 3.2 Efecto de los parámetros de extracción en el CFT

Lavecchia y Zuorro (2016) proponen que después de seleccionar la enzima adecuada para la extracción, se deben evaluar los efectos de otros parámetros de extracción en los rendimientos de extracción.

En esta investigación se aplicó un diseño experimental factorial  $2^4$  para analizar el efecto de la temperatura, el tiempo, el % E/S y el pH sobre la EAE. El CFT extraído de cáscara de mango osciló entre 26,30 y 44,29 mg GAE/g base seca (Tabla 1). Los parámetros y las interacciones que influyeron significativamente en el CFT se presentan en el diagrama de Pareto (Figura 1).

La interacción entre la temperatura y el tiempo fue significativa ( $p < 0,05$ ). El factor temperatura también tuvo un efecto positivo significativo ( $p < 0,05$ ) en el CFT. Cuando la temperatura aumentó de 20 °C a 40 °C, el TPC aumentó de 30,42 a 34,55 mg GAE/g base seca (Figura 2B). Estos resultados son similares a hallazgos anteriores reportados por Saad et al. (2019), donde el incremento de temperatura tuvo un efecto positivo al usar un tratamiento enzimático para liberar polifenoles a partir de orujo de frambuesa. Incrementar la temperatura podría acelerar la actividad enzimática, sin embargo, temperaturas mayores a la óptima ocasionarían una

desnaturalización de la enzima, como se ha observado en la extracción de flavonoides a partir de *Cajanus cajan* (Fu et al., 2008). Las altas temperaturas también podrían ocasionar la degradación de compuestos termolábiles (Prakash Maran et al., 2014). También, otros mecanismos involucrados en la extracción podrían explicar el incremento en el CFT de los extractos obtenidos cuando se eleva la temperatura. Estos son: menor tensión superficial y viscosidad del solvente, mejor solubilidad de los compuestos en el medio, incremento en el coeficiente de difusividad y el debilitamiento de la unión entre compuestos fenólicos y otras estructuras (Andres et al., 2020; Muniglia et al., 2014).

La interacción entre los parámetros temperatura y pH, y el factor pH tuvieron un efecto negativo significativo ( $p < 0,05$ ) en el CFT (Figura 1). Asimismo, Fu et al. (2008) observó que la mayor liberación de apigenina y luteolina se obtuvo cuando la EAE se realizó a valores de pH 3,50 y 4,00, respectivamente. El incremento en la extracción a valores de pH ácido podría deberse a que este factor cambia la conformación estructural de la enzima y por tanto, aumentaría su actividad; así como también a que mejora la plasticidad de la pared de la célula facilitando la liberación de compuestos (Bisswanger, 2014; Muniglia et al., 2014).

No se observó un efecto significativo del tiempo y el % E/S en los rangos evaluados ( $p < 0,05$ ) (Figura 1). Otros estudios tampoco han observado una mejor extracción cuando se utilizan dosis elevadas de enzima y se prolonga el tiempo de extracción (Le y Le, 2012; Shahram et al., 2019). Esto podría ser consecuencia del efecto inhibitorio de compuestos fenólicos extraídos sobre enzimas pectinolíticas, lo cual disminuye su acción enzimática (Chen et al., 2009).

El resultado obtenido sugiere que 60 min de incubación y 2 % E/S son suficientes para liberar compuestos fenólicos por EAE. Dosis altas de enzimas y tiempos de incubación prolongados representan un impacto económico negativo, por tanto, estos resultados son relevantes para la reducción de costos de producción a nivel industrial.

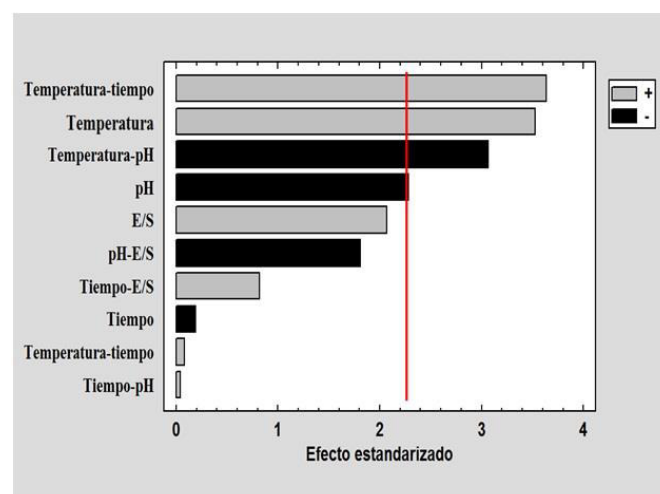
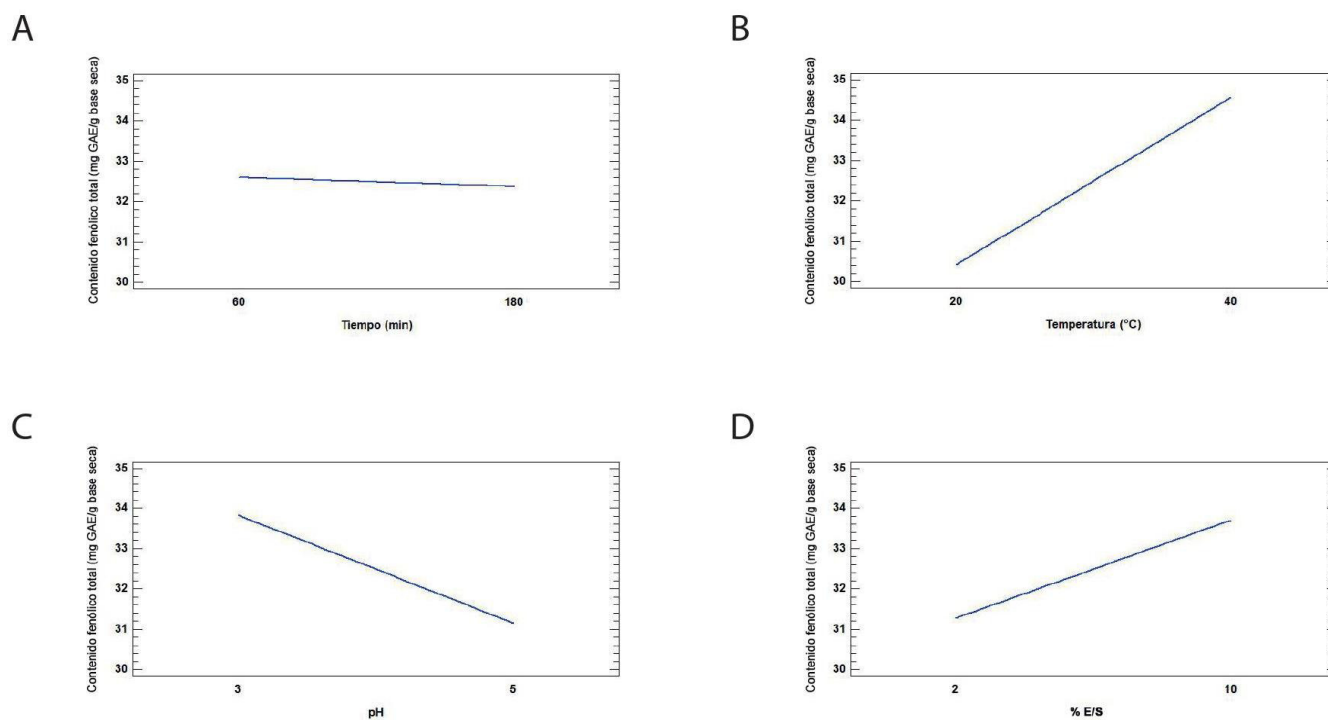


Figura 1. Diagrama de Pareto para CFT

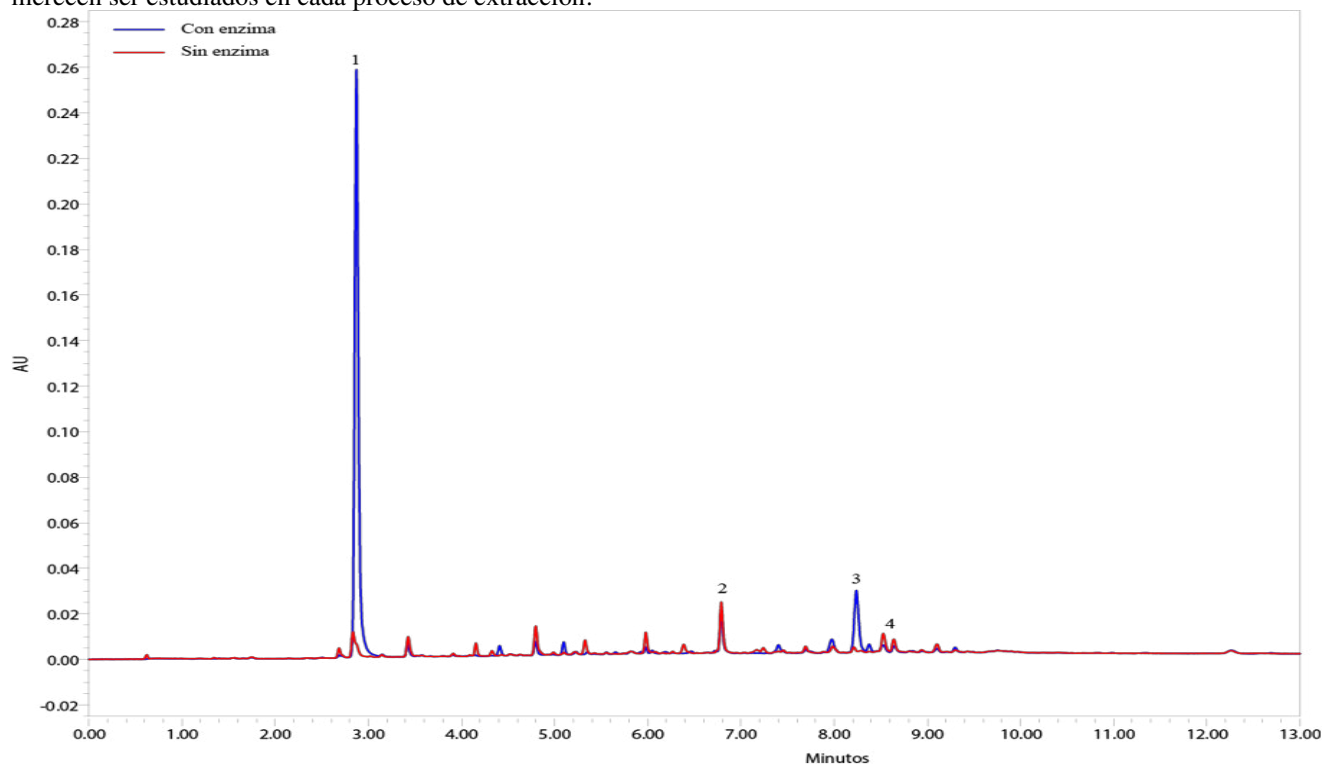


**Figura 2.** Efecto del tiempo (A); temperatura de incubación (B); pH (C) y % E/S (D) en la EAE de compuestos fenólicos de la cáscara de mango

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los parámetros seleccionados para obtener el perfil UPLC-PDA y para determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana son: incubación por 60 min a 40 °C, con 2 % E/S y a pH 3. Es importante destacar que los parámetros seleccionados de pH y temperatura no coinciden con los indicados como óptimos por los fabricantes de las enzimas, esto sugiere que estos efectos merecen ser estudiados en cada proceso de extracción.

### 3.3 Perfil de compuestos fenólicos por UPLC-PDA

Los perfiles fenólicos de extractos de cáscara de mango obtenidos por EAE en las condiciones seleccionadas antes mencionadas y sin adición de enzima (control) se muestran en la Figura 3. En ambos extractos se identificaron y cuantificaron: ácido gálico, mangiferina y rutina (Tabla 3).



**Figura 3.** Cromatograma UPLC-PDA. Línea azul: EAE con pectinasa. Línea roja: extracción sin enzima. Picos: 1, Ácido gálico; 2, Mangiferina; 3, No identificado; 4, Rutina. AU: unidades de absorbancia

El contenido de ácido gálico en el extracto de EAE ( $359,94 \pm 25,78$  mg/100 g base seca) fue 12 veces superior que el contenido en el extracto obtenido sin enzima ( $29,20 \pm 2,70$  mg/100 g base seca). De entre los compuestos de tipo fenólico analizados, presentes en cáscara de mango, el ácido gálico es más abundante. Sin embargo, su extracción requiere una etapa de hidrólisis, ya que éste se encuentra ligado a polisacáridos de la pared celular o en forma de galotaninos hidrolizables (Velderrain-Rodríguez et al., 2018). Los resultados sugieren que la enzima pectinasa hidrolizó enlaces de la pared celular, liberando este ácido fenólico. Esto se ha observado en el trabajo reportado por Martins et al. (2016), donde las enzimas tanasa, pectinasa y celulasa incrementaron la extracción de ácido gálico a partir de cáscara de uva.

El ácido gálico es un potente captador de radicales y posee una mayor biodisponibilidad, en comparación con otros polifenoles de mayor peso molecular (Carbonell-Capella et al., 2014; Marino et al., 2014). Por consiguiente, la cantidad liberada de este ácido fenólico por EAE podría considerarse un hallazgo importante para obtener extractos de mayor calidad.

En cuanto al contenido de rutina y mangiferina, no se observó una diferencia significativa entre ambos extractos.

En este estudio no se detectaron los flavanoides (+)-catequina, (+)-epicatequina y quercetina.

### 3.4 Efecto de la EAE sobre la actividad antioxidante *in vitro*

Los ensayos ABTS y ORAC son relevantes ya que los parámetros empleados para su obtención podrían afectar su actividad (Soto-Maldonado & Zúñiga-Hansen, 2017).

La actividad antioxidante *in vitro* presentada por los extractos evaluados está acorde a estudios previos sobre cáscara de mango ecuatoriano (Figura 4), donde Marcillo-Parra et al. (2021) y Ruales et al. (2018) reportaron una actividad antioxidante de 24 a 34,60 mM Trolox/100 g base seca en el ensayo ABTS y 29,87 mM Trolox/100 g base seca en el ensayo ORAC, respectivamente.

Por otro lado, ensayo ABTS demostró una actividad antioxidante aproximadamente 1,65 veces mayor cuando los extractos se obtuvieron mediante EAE.

**Tabla 3.** Compuestos fenólicos identificados mediante UPLC-PDA

\* Contenido fenólico total determinado mediante ensayo Folin-Ciocalteu,

Compuestos	Concentración (mg/100 g base seca)	
	Extracción asistida por enzima	Extracción sin enzima (control)
*Contenido fenólico total	$3500,23 \pm 0,44$ <sub>a</sub>	$2383,99 \pm 4,66$ <sub>b</sub>
Ácido gálico	$359,94 \pm 25,78$ <sub>a</sub>	$29,20 \pm 2,7$ <sub>b</sub>
Mangiferina	$23,04 \pm 2,29$ <sub>a</sub>	$19,35 \pm 1,04$ <sub>a</sub>
Rutina	$13,51 \pm 1,91$ <sub>a</sub>	$22,76 \pm 7,14$ <sub>a</sub>
Quercetina	N.d.	N.d.
(-)-Epicatequina	N.d.	N.d.
(+)-Catequina	N.d.	N.d.

expresado como mg EAG/100 g base seca. Los valores de medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ( $n = 3$ ). N.d.: no detectado.

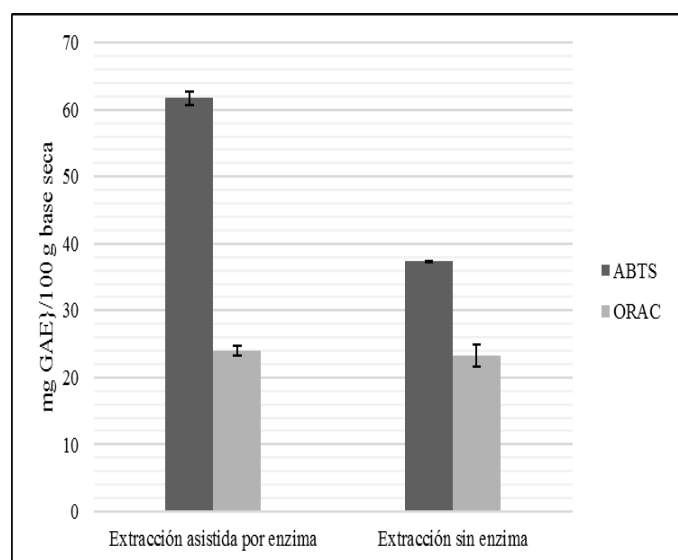
Previamente, otros estudios han demostrado que mediante la EAE se pueden obtener extractos con mayor actividad antioxidante. Zhou et al. (2017) aplicó un proceso de EAE donde obtuvo una mayor actividad antioxidante comparado con otros métodos. Las condiciones de extracción que se emplean en la EAE, así como la mayor liberación de compuestos con potencial antioxidante podría explicar el incremento en la capacidad captadora de radicales libres (Soto-Maldonado y Zúñiga-Hansen, 2017).

Por otra parte, cuando se empleó el ensayo ORAC no se evidenció diferencias significativas en la actividad antioxidante entre la EAE y el proceso sin enzima. Los diferentes resultados obtenidos en los ensayos ABTS y ORAC podrían atribuirse al mecanismo de captación/eliminación de radicales detectado por cada método. El mecanismo de acción del ensayo ORAC se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), mientras que la neutralización del radical ABTS<sup>+</sup> puede ocurrir tanto por HAT como por transferencia de electrones (SET) (Craft et al., 2012).

Teniendo esto en cuenta, se podría inferir que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por EAE sigue principalmente el mecanismo SET.

### 3.5 Actividad antimicrobiana

Las muestras diluidas analizadas no presentaron actividad antibacteriana frente a la cepa usada *E. coli*, mientras que, la mayor concentración analizada del extracto obtenido mediante extracción sin enzima (2 500 µg/mL) inhibió el crecimiento de *S. aureus*. La CMB de este extracto estuvo por encima del rango de concentración probado (19,53 a 2 500 µg/mL) (Tabla 4).



**Figura 4.** Efecto de la EAE en el CFT

**Table 4.** Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos mediante EAE con enzima pectinasa

Microorganismo	Extracción asistida por enzima		Extracción sin enzima		Ampicilina	
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Escherichia coli</i>	>2500	N.d.	>2500	N.d.	1,95	15,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	>2500	N.d.	2500	>2500	<0,49	62,50

\*N.d.: No determinada

Otras investigaciones han atribuido esta actividad inhibitoria de la cáscara de mango principalmente a su contenido fenólico (Arbos et al., 2013; Huang et al., 2018). Si bien la EAE logró incrementar el CFT de los extractos, el hecho de que este extracto no haya mostrado actividad antibacteriana podría atribuirse al diferente perfil de compuestos fenólicos que se obtiene al emplear este método. La mangiferina y galotaninos son compuestos fenólicos presentes en mango que presentan actividad antimicrobiana relacionada a su capacidad de formar complejos con iones metálicos. De igual forma, el ácido gálico puede complejar iones metálicos, sin embargo, su capacidad es menor en comparación a compuestos taninos de mayor tamaño molecular, lo cual podría justificar la menor actividad antimicrobiana del extracto obtenido mediante EAE (Engels et al., 2012).

La mayor resistencia de *E. coli* frente a compuestos presentes en mango se ha observado en otras investigaciones y podría ser atribuida a la estructura poco permeable de su membrana externa (Engels et al., 2011).

Huang et al. (2018) usaron residuos agroindustriales de mango y determinaron que éstos tienen actividad antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*, no obstante, usaron otro método de extracción, así como mayores concentraciones de los extractos.

#### 4. CONCLUSIONES

La extracción asistida por enzimas incrementó la liberación de compuestos de tipo fenólico a partir de cáscara de mango, siendo las enzimas pectinasa y celulasa:pectinasa (1:1, m/m) las que lograron mayores incrementos. Los factores temperatura y pH fueron significativos en la extracción asistida por pectinasa. En cuanto al perfil cromatográfico de compuestos fenólicos (UPLC-PDA), en el extracto obtenido mediante EAE se identificó mangiferina, rutina y ácido gálico, siendo el contenido de este ácido fenólico significativamente mayor al control sin enzima. Además, los resultados revelaron que la EAE pectinasa mejoró la actividad antioxidante, pero no la actividad antimicrobiana. Estos resultados demuestran que la EAE es un método que podría emplearse en la extracción de compuestos antioxidantes con aplicabilidad la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Futuros estudios deben enfocarse en la optimización y el análisis tecnológico de este proceso de extracción para su implementación a gran escala.

#### AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue desarrollada en el marco de la RED VLIR – Ecuador para programas de posgrado. La presente

investigación contó con el auspicio financiero del proyecto TEAM2017PR442-75644 VLIR-USO. Agradecemos a Maritza Molina y Yadira Quimbita por el soporte técnico durante los análisis. AB agradece a SENESCYT por el apoyo financiero recibido durante el programa de posgrado.

#### REFERENCIAS

- Ajila, C. M., & Prasada Rao, U. J. S. (2013). Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.017>
- Andres, A. I., Petron, M. J., Lopez, A. M., & Timon, M. L. (2020). Optimization of Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and In Vitro Antioxidant Activity in Craft Brewers' Spent Grain Using Response Surface Methodology (RSM). *Foods*, 9(10), 1398. <https://doi.org/10.3390/foods9101398>
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (18va ed.).
- Arbos, K. A., Stevani, P. C., & Castanha, R. de F. (2013). Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Revista Ceres*, 60(2), 161–165. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200003>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1–6), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- Cendrowski, A., Kraśniewska, K., Przybył, J. L., Zielińska, A., & Kalisz, S. (2020). Antibacterial and Antioxidant Activity of Extracts from Rose Fruits (*Rosa rugosa*). *Molecules*, 25(6), 1365. <https://doi.org/10.3390/molecules25061365>
- Chamorro, S., Viveros, A., Alvarez, I., Vega, E., & Brenes, A. (2012). Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry*, 133(2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.031>
- Chen, C.-H., Wu, M.-C., Hou, C.-Y., Jiang, C.-M., Huang, C.-

- M., & Wang, Y. T. (2009). Effect of Phenolic Acid on Antioxidant Activity of Wine and Inhibition of Pectin Methyl Esterase. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(4), 328–333. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00388.x>
- CLSI. (2015). *M07-A10: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (Issue January). [www.clsi.org](http://www.clsi.org)
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M. L., & Plaza, M. (2021). Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (*Prunus avium* L.) pomace. *Food Chemistry*, 339, 128086. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128086>
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., & de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57, 51–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.012>
- 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(1), 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.008>
- 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(7), 2215–2223. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-10>
- Fernández, K., Vega, M., & Aspé, E. (2015). An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry*, 168, 7–13. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.07.021>
- Fu, Y.-J., Liu, W., Zu, Y.-G., Tong, M.-H., Li, S.-M., Yan, M.-M., Efferth, T., & Luo, H. (2008). Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanuscajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, 111(2), 508–512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.003>
- García-Mendoza, M. P., Paula, J. T., Paviani, L. C., Cabral, F. A., & Martínez-Correa, H. A. (2015). Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized solvent processes. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.026>
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., & Ferreira, I. C. F. R. F. R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 302–315. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.03.029>
- Gómez-García, R., Martínez-Ávila, G. C. G., & Aguilar, C. N. (2012). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech*, 2(4), 297–300. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0055-7>
- Goodger, J. Q. D., Seneratne, S. L., Nicolle, D., & Woodrow, I. E. (2016). Foliar Essential Oil Glands of Eucalyptus Subgenus Eucalyptus (Myrtaceae) Are a Rich Source of Flavonoids and Related Non-Volatile Constituents. *PloS One*, 11(3), e0151432–e0151432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151432>
- Huang, C.-Y., Kuo, C.-H., Wu, C.-H., Kuan, A.-W., Guo, H.-R., Lin, Y.-H., & Wang, P.-K. (2018). Free Radical-Scavenging, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Activities of Water and Ethanol Extracts Prepared from Compressional-Puffing Pretreated Mango (*Mangifera indica* L.) Peels. *Journal of Food Quality*, 2018, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/1025387>
- Laroze, L., Soto, C., & Elvira, M. (2010). Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *13(6)*, 11–12. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-12>
- Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2016). Chapter 19 - Cellulase Applications in Pigment and Bioactive Compound Extraction (V. K. B. T.-N. and F. D. in M. B. and B. Gupta (ed.); pp. 209–222). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00019-8>
- Le, H. Van, & Le, V. V. M. (2012). Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), 1206–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02960.x>
- Lotfi, L., Kalbasi-Ashtari, A., Hamed, M., & Ghorbani, F. (2015). Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability. *23(2)*, 210–218.

<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.011>

Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Kumari Dubey, K., & Singhal, R. S. (2019). Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 25, 62–72. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.02.009>

Marcillo-Parra, V., Anaguano, M., Molina, M., Tupuna-Yerovi, D. S., & Ruales, J. (2021). Characterization and quantification of bioactive compounds and antioxidant activity in three different varieties of mango (*Mangifera indica* L.) peel from the Ecuadorian region using HPLC-UV/VIS and UPLC-PDA. *NFS Journal*, 23, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.02.001>

Marino, T., Galano, A., & Russo, N. (2014). Radical Scavenging Ability of Gallic Acid toward OH and OOH Radicals. Reaction Mechanism and Rate Constants from the Density Functional Theory. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(35), 10380–10389. <https://doi.org/10.1021/jp505589b>

Martins, I. M., Roberto, B. S., Blumberg, J. B., Chen, C.-Y. O., & Macedo, G. A. (2016). Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. *Food Research International*, 89, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.009>

Muniglia, L., Claisse, N., Baudet, P.-H., & Ricochon, G. (2014). *Enzymatic Aqueous Extraction (EAE)* (pp. 167–204). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43628-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43628-8_8)

Mushtaq, M., Sultana, B., Akram, S., Adnan, A., Owusu-Apenten, R., & Nigam, P. Enzyme-assisted extraction of polyphenols from pomegranate (*Punica granatum*) Peel. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5, 27–34.

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. H. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.020>

Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309–330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>

Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2011). Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12713–12724. <https://doi.org/10.1021/jf203372w>

Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Extraction, multi-response analysis, and optimization of biologically active phenolic compounds from the pulp of Indian jamun fruit. *Food Science and*

*Biotechnology*, 23(1), 9–14. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0002-y>

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>

Rakariyatham, K., Liu, X., Liu, Z., Wu, S., Shahidi, F., Zhou, D., & Zhu, B. (2020). Improvement of Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Longan (*Dimocarpus longan*) Peel Extracts by Enzymatic Treatment. *Waste and Biomass Valorization*, 11(8), 3987–4002. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00723-9>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Ruales, J., Baenas, N., Moreno, D. A., Stinco, C. M., Mel, A. J., & Garc, A. (2018). Biological Active Ecuadorian Mango ‘Tommy Atkins’ Ingredients — An Opportunity to Reduce Agrowaste. *Nutrients*, 10(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu10091138>

Rungpichayapichet, P., Mahayothee, B., Khuwijitjaru, P., Nagle, M., & Müller, J. (2015). Non-destructive determination of  $\beta$ -carotene content in mango by near-infrared spectroscopy compared with colorimetric measurements. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 32–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.10.013>

Saad, N., Louvet, F., Tarrade, S., Meudec, E., Grenier, K., Landolt, C., Ouk, T. S., & Bressollier, P. (2019). Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Pomace. *Journal of Food Science*, 84(6), 1371–1381. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14625>

Safdar, M. N., Kausar, T., & Nadeem, M. (2017). Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the Mango Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13028. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13028>

Saini, J. K., Patel, A. K., Adsul, M., & Singhania, R. R. (2016). Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renewable Energy*, 98, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.089>

Shahram, H., Dinani, S. T., & Amouheydari, M. (2019). Effects of pectinase concentration, ultrasonic time, and pH of an ultrasonic-assisted enzymatic process on extraction of phenolic compounds from orange processing waste. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 487–498. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9962-6>

Sigma Aldrich. (2021). No Title. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/product/sigma/p4716?c>

ontext=product

Soto-Maldonado, C., & Zúñiga-Hansen, M. E. (2017). Enzyme-Assisted Extraction of Phenolic Compounds. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 369–384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00014-0>

Velderrain-Rodríguez, G., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M., Ayala-Zavala, J., Robles-Zepeda, R., Wall-Medrano, A., & González-Aguilar, G. (2018). Gallic Acid Content and an Antioxidant Mechanism Are Responsible for the Antiproliferative Activity of ‘Ataulfo’ Mango Peel on LS180 Cells. *Molecules*, 23(3), 695. <https://doi.org/10.3390/molecules23030695>

Wang, L., Wu, Y., Liu, Y., & Wu, Z. (2017). Complex Enzyme-Assisted Extraction Releases Antioxidative Phenolic Compositions from Guava Leaves. *Molecules*, 22(10), 1648. <https://doi.org/10.3390/molecules22101648>

Yadav, G., Singh, A., Bhattacharya, P., Yuvraj, J., & Banerjee, R. (2013). Comparative analysis of solid-state bioprocessing and enzymatic treatment of finger millet for mobilization of bound phenolics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), 1563–1569. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0924-4>

Zhou, Z., Shao, H., Han, X., Wang, K., Gong, C., & Yang, X. (2017). The extraction efficiency enhancement of polyphenols from *Ulmus pumila* L. barks by trienzyme-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 97, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.060>



## **FICHAS TÉCNICAS**

## ÍNDICE DE FICHAS TÉCNICAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>FICHA TÉCNICA I</b>	
Caracterización de la muestra	15
<b>FICHA TÉCNICA II</b>	
Especificaciones técnicas de las enzimas	19
<b>FICHA TÉCNICA III</b>	
Niveles el diseño experimental 2 <sup>4</sup>	21
<b>FICHA TÉCNICA IV</b>	
Dosificación de las enzimas	23
<b>FICHA TÉCNICA V</b>	
Contenido fenólico total de extractos obtenidos en la selección de la enzima	25
<b>FICHA TÉCNICA VI</b>	
Análisis estadístico del contenido fenólico total de extractos obtenidos en la selección de la enzima	27
<b>FICHA TÉCNICA VII</b>	
Contenido fenólico total de extractos obtenidos en el diseño experimental factorial	29
<b>FICHA TÉCNICA VIII</b>	
Análisis estadístico del diseño experimental	31
<b>FICHA TÉCNICA XIX</b>	
Cuantificación de ácido gálico mediante UPLC-PDA	33
<b>FICHA TÉCNICA X</b>	
Análisis estadístico de la cuantificación de ácido gálico mediante UPLC-PDA	35

**FICHA TÉCNICA XI**

Cuantificación de mangiferina mediante UPLC-PDA 36

**FICHA TÉCNICA XII**

Análisis estadístico de la cuantificación de mangiferina mediante UPLC-PDA 38

**FICHA TÉCNICA XIII**

Cuantificación de rutina mediante UPLC-PDA 39

**FICHA TÉCNICA XIV**

Análisis estadístico de la cuantificación de rutina mediante UPLC-PDA 41

**FICHA TÉCNICA XV**

Actividad antioxidante mediante ensayo ABTS<sup>+</sup> 42

**FICHA TÉCNICA XVI**

Análisis estadístico de la actividad antioxidante mediante ensayo ABTS<sup>+</sup> 44

**FICHA TÉCNICA XVII**

Actividad antioxidante mediante ensayo ORAC 45

**FICHA TÉCNICA XVIII**

Análisis estadístico de la actividad antioxidante mediante ensayo ORAC 46

**FICHA TÉCNICA XIX**

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* 48

**FICHA TÉCNICA XX**

Determinación de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico de referencia frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* 50

## FICHA TÉCNICA I

### CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA

**Muestra:** Cáscara liofilizada de mango (*Mangifera indica*) var. Tommy Atkins

**Objetivo:** Determinar el porcentaje de humedad, contenido fenólico total y actividad antioxidante de la muestra.

#### Desarrollo:

- **Humedad**

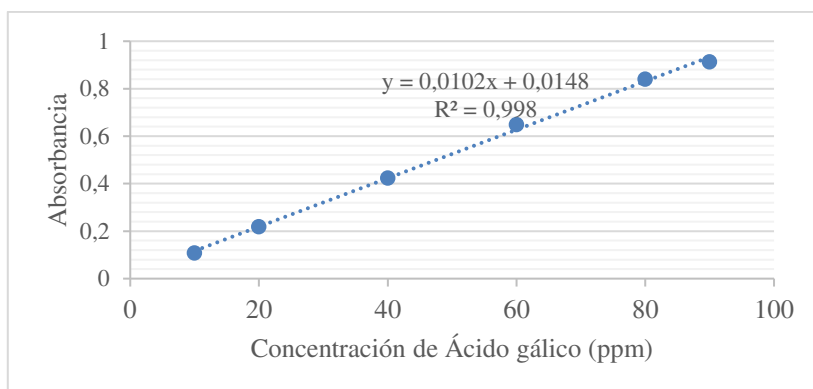
Se determinó el porcentaje de humedad mediante el método descrito por la norma AOAC 925.10 (AOAC, 2005). Los resultados se presentan en la Tabla FTL.1.

**Tabla FTL.1** Humedad de la cáscara liofilizada de mango

Réplica	Resultado (g/100 g muestra)	Promedio (g/100 g muestra)	Desviación
1	8,56	8,58	0,09
2	8,50		
3	8,68		

- **Contenido fenólico total**

Se determinó el contenido fenólico total mediante ensayo de Folin–Ciocalteu (Georgé et al., 2005). La curva de calibración usada para la determinación del CFT se presenta en la Figura FTL.1.



**Figura FTI.1** Curva de calibración para determinar el CFT de la muestra

El CFT se calculó mediante la ecuación FTI.1

$$CFT = \frac{Abs-b}{m} \times \frac{fd \times v}{p} \quad [FTI.1]$$

Donde:

*b*: Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

*m*: Pendiente de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

*fd*: Factor de dilución

*v*: Volumen de solvente (L)

*p*: Peso seco de la muestra (g)

Los resultados se presentan en la Tabla FTI.2.

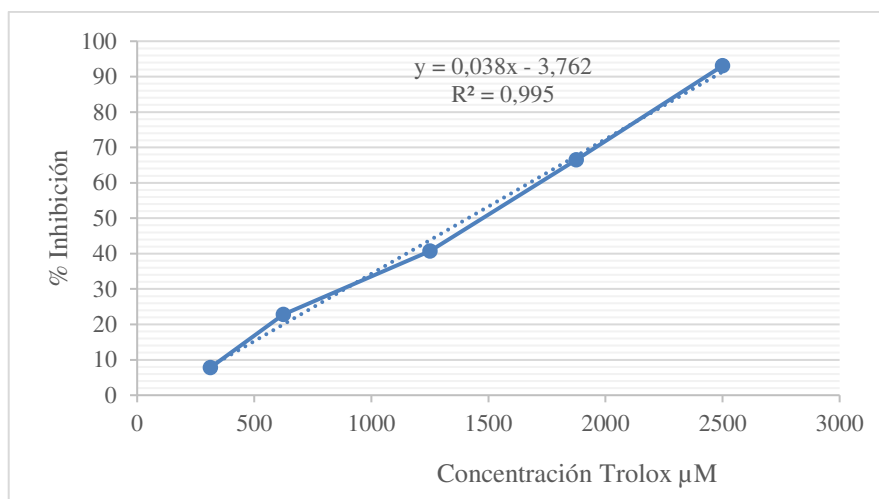
**Tabla FTI.2** Contenido fenólico total de la cáscara liofilizada de mango

Réplica	Resultado (mg EAG/g base seca)	Promedio (mg EAG/g base seca)	Desviación
1	42,80	42,88	1,94
2	40,98		
3	44,86		

- Actividad antioxidante**

Se determinó la actividad antioxidante mediante ensayo ABTS<sup>+</sup> (Re et al., 1999).

La curva de calibración usada para la determinación de la actividad antioxidante se presenta en la Figura FTI.2.



**Figura FTI.2** Curva de calibración para determinar la actividad antioxidante de la muestra

Para determinar el % de inhibición se utilizó la Ecuación FTI.2:

$$\bullet \quad \% \text{ inhibición} = \frac{A_o - A_f}{A_o} \times 100 \quad [\text{FTI.2}]$$

Donde:

$A_o$ : Absorbancia de la solución de ABTS<sup>+</sup>

$A_f$ : Absorbancia de la mezcla de reacción después de 6 min

Mediante la ecuación FTI.3 se calculó la actividad antioxidante expresada como mM Trolox/100 g base seca.

$$\text{Actividad antioxidante} = \frac{\% \text{ inhibición} - b}{m} \times \frac{fd \times v \times 10}{p} \quad [\text{FTI.3}]$$

Donde:

$b$ : Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$fd$ : Factor de dilución

$v$ : Volumen de solvente (l)

$p$ :      Peso seco de la muestra (g)

Los resultados se presentan en la Tabla FTI.3.

**Tabla FTI.3** Actividad antioxidante de la cáscara liofilizada de mango

<b>Réplica</b>	<b>Resultado (<math>\mu\text{M}</math> ET/100 g base seca)</b>	<b>Promedio (<math>\mu\text{M}</math> ET/100 g base seca)</b>	<b>Desviación</b>
1	64,56	64,57	0,13
2	64,45		
3	64,70		


## FICHA TÉCNICA II

### ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LAS ENZIMAS

**Objetivo:** Conocer la actividad enzimática, condiciones de operación y almacenamiento de las enzimas comerciales empleadas.

**Desarrollo:**

Las especificaciones técnicas de las enzimas declaradas por los fabricantes se muestran en la Figura FTII.1 y Figura FTII.2.

	
<div> <div>3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA</div> <div>Website: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a></div> <div>Email USA: <a href="mailto:techserv@sial.com">techserv@sial.com</a></div> <div>Outside USA: <a href="mailto:eurtechserv@sial.com">eurtechserv@sial.com</a></div> </div>	
<div> <div>Product Specification</div> <div> <div>Product Name:</div> <div>Cellulase from <i>Aspergillus niger</i> – powder, <math>\geq 0.3</math> units/mg solid</div> </div> <div> <div>Product Number:</div> <div>C1184</div> </div> <div> <div>CAS Number:</div> <div>9012-54-8</div> </div> <div> <div>MDL:</div> <div>MFCD00081510</div> </div> <div> <div>Storage Temperature:</div> <div>2 - 8 °C</div> </div> </div>	
TEST	Specification
units/mg solid	$\geq 0.3$
Cellulase Activity	
Unit Definition:	One unit will liberate 1.0 micromole of Glucose from Cellulose in 1 hr at pH 5.0 at 37 deg C (2 hr incubation time).
Specification: PRD.0.ZQ5.10000039029	

**Figura FTII.1** Ficha técnica de enzima celulasa C1184



**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Product Specification

Product Name:

Pectinase from *Aspergillus niger* – BioReagent, suitable for plant cell culture, aqueous glycerol solution,  
≥5 units/mg protein (Lowry)

Product Number:

**P4716**

CAS Number:

9032-75-1

MDL:

MFCD00131809

Storage Temperature:

2 - 8 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Brown
Appearance (Form)	Liquid
Appearance (Turbidity)	Clear
Enzymatic Activity	≥ 5
units/mg protein	
One unit will liberate 1.0 micromole of galacturonic acid from polygalacturonic acid per minute at pH 4.0 at 25 deg C.	
mg protein/ml (Lowry)	≥ 5
with TCA precipitation	
Glycerol Content	30 - 50 %
Plant Cell Culture Test	Pass

Specification: PRD.2.ZQ5.10000007268

## FTIL.2 Ficha técnica de enzima pectinasa P4716

## FICHA TÉCNICA III

### NIVELES EL DISEÑO EXPERIMENTAL 2<sup>4</sup>

**Objetivo:** Determinar el rango de los niveles para los factores tiempo, temperatura, % E/S y pH.

**Desarrollo:**

Para cada factor, el rango experimental se basó en datos reportados en la literatura para otras matrices y en la ficha técnica de las enzimas. En la Tabla FTIII.1 se muestran los datos de la revisión bibliográfica. En la Tabla FTIII.2 se muestran los niveles de los factores usados en el diseño experimental 2<sup>4</sup>.

**Tabla FTIII.1** Condiciones de operación de la enzima pectinasa reportadas en bibliografía

Enzima	Matriz	Rango evaluado	Referencia
<b>Tiempo</b>			
Pectinex	Tépalos de azafrán	60 min	(Lotfi et al., 2015)
Pectinex Ultra SLP	Cáscara de uva	180 min	(Fernández et al., 2015)
<b>Temperatura</b>			
Pectinasa Sigma-Aldrich-P4716	Hojas de eucalipto	40 °C	(Goodger et al., 2016)
Pectinasa Sigma-Aldrich-P4716	-	25 °C	(Sigma Aldrich, 2021)
<b>% E/S</b>			
Pectinex Ultra SLP	Cáscara de uva	10 %	(Fernández et al., 2015)
Pectinex	Tépalos de azafrán	5 %	(Lotfi et al., 2015)
Pectinex Ultra SLP	Cáscara de granada	2,8 %	(Mushtaq et al.)
<b>pH</b>			
Pectinex	Tépalos de azafrán	3,5	(Lotfi et al., 2015)
Pektozyme	Orujo de uva	5,5	(Chamorro et al., 2012)
Pectinasa Sigma-Aldrich-P4716	-	4	(Sigma Aldrich, 2021)

E/S: enzima/sustrato

En la Tabla FTIII.2 se muestran los niveles de los factores usados en el diseño experimental  $2^4$ .

**Tabla FTIII.2** Factores evaluados mediante el diseño experimental  $2^4$  y sus niveles

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>		
	<b>Bajo (-1)</b>	<b>Intermedio (0)</b>	<b>Alto (+1)</b>
Tiempo	60	120	180
Temperatura	20	30	40
% E/S	2	6	10
pH	2	3	4

E/S: enzima/sustrato

## FICHA TÉCNICA IV

### DOSIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas

**Objetivo:** Calcular la cantidad de enzima a añadir en cada tratamiento.

**Desarrollo:**

La dosificación de la enzima celulasa se calculó mediante la ecuación FTIV.1

$$mg \text{ Celulasa} = (0,5 \times e \times 10) \quad [\text{FTIV.1}]$$

Donde:

$e$ : Porcentaje de enzima celulasa

Considerando las especificaciones técnicas de la enzima, la dosificación de la enzima pectinasa se calculó mediante la ecuación FTIV.2

$$mL \text{ Pectinasa} = \frac{0,5 \times e \times 10}{d} \quad [\text{FTIV.2}]$$

Donde:

$e$ : Porcentaje de enzima pectinasa

$d$ : 40 mg proteína/1 ml enzima (especificada en frasco de enzima)

La dosificación de las enzimas para el primer experimento de selección de la enzima se muestra en la Tabla FTIV.1. La dosificación de las enzimas para el diseño factorial se presenta en la Tabla FTIV.2.

**Tabla FTIV.1** Dosificación de las enzimas para el primer experimento

Tratamiento	mg enzima celulasa	U celulosa/g cáscara de mango liofilizada	μL enzima pectinasa	U pectinasa/g cáscara de mango liofilizada
Celulasa	25	>15	-	-
Pectinasa	-	-	625	>250
Celulasa:pectinasa	12,5	>7,5	310	>125
Control	-	-	-	-

**Tabla FTIV.2** Dosificación de la enzima pectinasa para el diseño factorial.

Ensayo	Tratamiento	mL enzima pectinasa	U pectinasa/g cáscara de mango liofilizada
1	180 min, 40 °C, pH 3, 2 %	0,25	>100
2	60 min, 40 °C, pH 5, 10 %	1,25	>500
3	180 min, 20 °C, pH 3, 2 %	0,25	>100
4	60 min, 20 °C, pH 3, 10 %	1,25	>500
5	120 min, 30 °C, pH 4, 6 %	0,75	>300
6	180 min, 40 °C, pH 3, 10 %	1,25	>500
7	60 min, 20 °C, pH 5, 10 %	1,25	>500
8	60 min, 40 °C, pH 3, 10 %	1,25	>500
9	180 min, 20 °C, pH 5, 2 %	0,25	>100
10	120 min, 30 °C, pH 4, 6 %	0,75	>300
11	60 min, 20 °C, pH 3, 2 %	0,25	>100
12	60 min, 40 °C, pH 5, 2 %	0,25	>100
13	180 min, 40 °C pH 5, 2 %	0,25	>100
14	60 min, 20 °C, pH 5, 2 %	0,25	>100
15	180 min, 20 °C, pH 5, 10 %	1,25	>500
16	180 min, 20 °C, pH 3, 10 %	1,25	>500
17	60 min, 40 °C, pH 3, 2 %	0,25	>100
18	180 min, 40 °C, pH 5, 10 %	1,25	>500
19	120 min, 30 °C, pH 4, 6 %	0,75	>300
20	120 min, 30 °C, pH 4, 6 %	0,75	>300

## FICHA TÉCNICA V

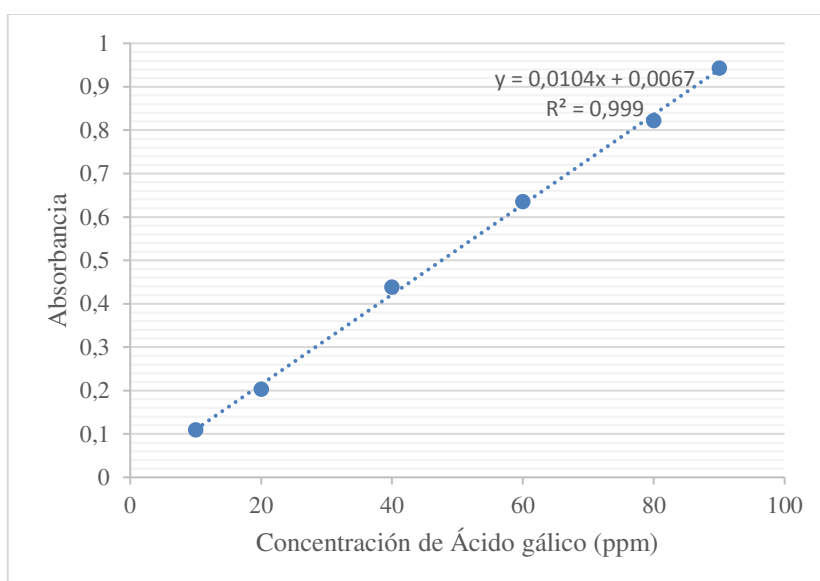
### CONTENIDO FENÓLICO TOTAL DE EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA SELECCIÓN DE LA ENZIMA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas

**Objetivo:** Determinar el CFT de los extractos obtenidos en la selección preliminar de la enzima.

**Desarrollo:**

Se determinó el contenido fenólico total mediante ensayo de Folin–Ciocalteu (Georgé et al., 2005). La curva de calibración usada para la determinación del CFT se presenta en la Figura FTV.1.



**Figura FTV.1** Curva de calibración para determinar el CFT de la muestra

El CFT se calculó mediante la ecuación FTV.1

$$CFT = \frac{Abs-b}{m} \times \frac{fd \times v}{p} \quad [FTV.1]$$

Donde:

$b$ : Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$fd$ : Factor de dilución

$v$ : Volumen de solvente (L)

$p$ : Peso seco de la muestra (g)

## FICHA TÉCNICA VI

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL DE EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA SELECCIÓN DE LA ENZIMA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en la selección de la enzima

**Desarrollo:**

El análisis estadístico se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Se aplicó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados se presentan en la Tabla FTVI.1.

**Tabla FTVI.1** Tabla ANOVA para CFT por enzima

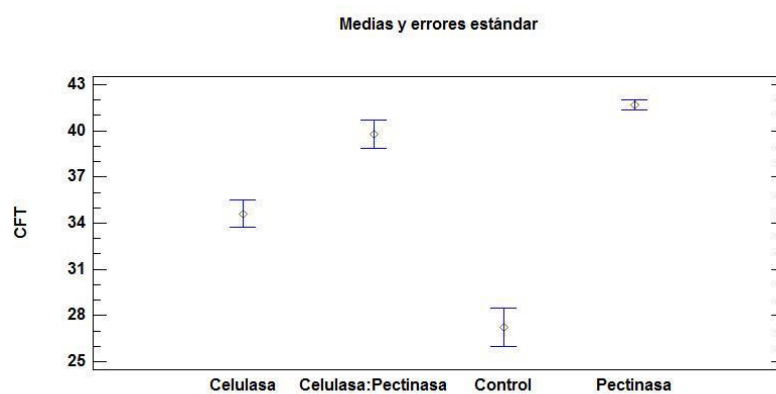
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,7402E6	3	1,25E6	49,73	0,0000
Intra grupos	200782,	8	2,51E4		
Total (Corr.)	3,9448E6	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de CFT entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95 % de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras se aplicó la prueba LSD de Fisher. Los resultados se presentan en la Tabla FTVI.2 y la Figura FTVI.1.



**Tabla FTVI.2** Prueba de Múltiple Rangos para CFT por Tratamiento

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	27,23	X
Celulasa	3	34,62	X
Celulasa:pectinasa	3	39,76	X
Pectinasa	3	41,65	X

(LSD,  $p < 0,05$ )**Figura FTVI.1** Gráfica de medias para el CFT

## FICHA TÉCNICA VII

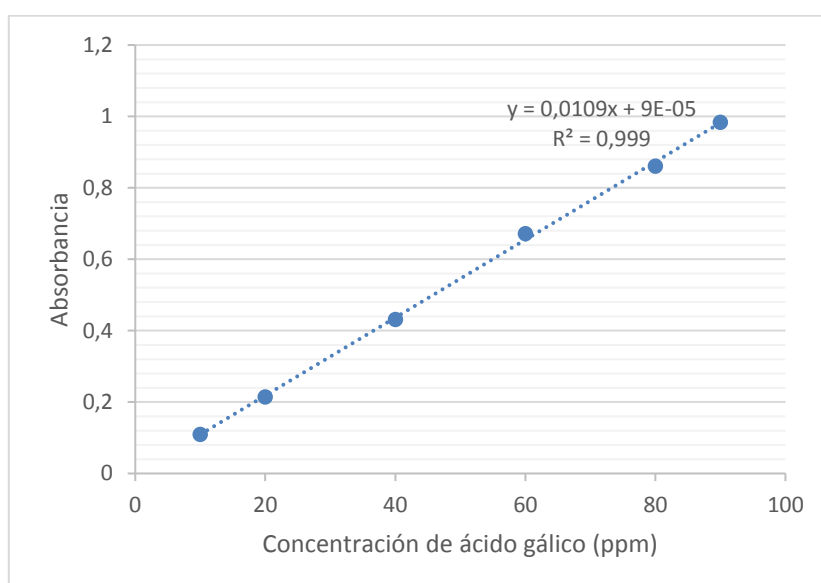
### CONTENIDO FENÓLICO TOTAL DE EXTRACTOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas en el diseño experimental factorial

**Objetivo:** Determinar el CFT de los extractos obtenidos en el diseño experimental factorial.

**Desarrollo:**

Se determinó el contenido fenólico total mediante ensayo de Folin–Ciocalteu (Georgé et al., 2005). La curva de calibración usada para la determinación del CFT se presenta en la Figura FTVII.1.



**FTVII.1** Curva de calibración para determinar el CFT de la muestra

El CFT se calculó mediante la ecuación FTVII.1

$$CFT = \frac{Abs-b}{m} \times \frac{fd \times v}{p} \quad [FTII.1]$$

Donde:

$b$ : Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para el contenido fenólico total

$m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para el contenido fenólico total

$fd$ : Factor de dilución

$v$ : Volumen de solvente (L)

$p$ : Peso seco de la muestra (g)

## FICHA TÉCNICA VIII

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en la selección de la enzima.

**Desarrollo:**

El análisis estadístico de los datos generados por el diseño experimental se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Los resultados se presentan en la Tabla FTVIII.1.

**Tabla FTVIII.1.** Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	68,39	1	68,39	12,43	0,0065
B:Tiempo	0,20	1	0,20	0,04	0,8523
C:pH	28,61	1	28,61	5,20	0,0485
D:E/S	23,58	1	23,58	4,29	0,0683
AB	72,61	1	72,61	13,20	0,0055
AC	51,74	1	51,74	9,40	0,0134
AD	0,04	1	0,04	0,01	0,9373
BC	0,01	1	0,01	0,00	0,9690
BD	3,67	1	3,67	0,67	0,4349
CD	18,07	1	18,07	3,29	0,1033
Error total	49,51	9	5,50		
Total (corr.)	316,42	19			
R-cuadrada = 84,35 porciento R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 66,97 porciento Error estándar del est. = 2,34 Error absoluto medio = 1,45 Estadístico Durbin-Watson = 2,10 (P=0,4599) Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,08					

La tabla ANOVA particiona la variabilidad del Contenido fenólico total en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia

estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 4 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica 84 % de la variabilidad en Contenido fenólico total. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 67 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 2,34. El error medio absoluto (MAE) de 1,44 es el valor promedio de los residuos. No hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5 %, según el estadístico de Durbin Watson.

## FICHA TÉCNICA IX

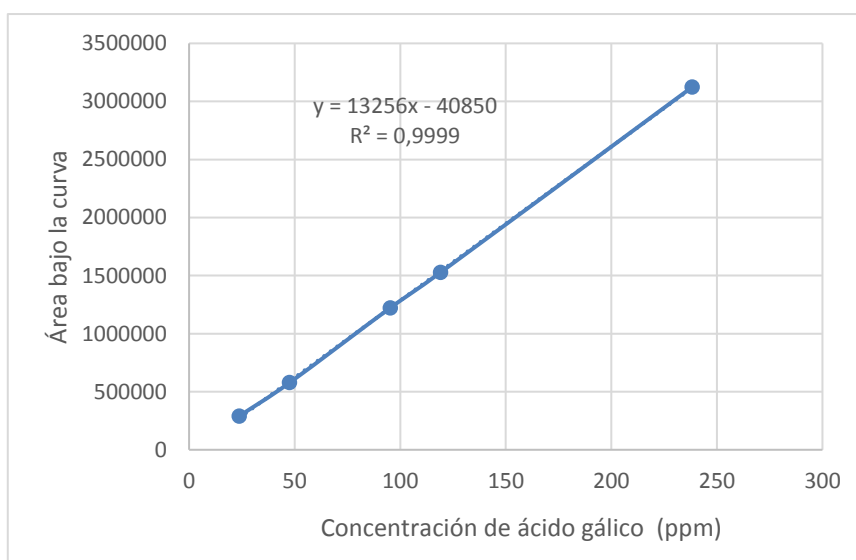
### CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GALICO MEDIANTE UPLC-PDA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Cuantificar el contenido de ácido gálico en los extractos

#### Desarrollo:

La curva de calibración usada para determinación de la concentración de ácido gálico en los extractos se presenta en la Figura FTIX.1.



**Figura FTIX.1** Curva de calibración para determinar el contenido de ácido gálico en la muestra

El contenido de ácido gálico expresado como mg/100 g base seca se calculó mediante la ecuación FTIX.1

$$\text{Contenido de ácido gálico} = \frac{AUC - b}{m} \times \frac{v_e}{v_m \times p \times 10} \quad [\text{FTIX.1}]$$

Donde:

$AUC$ : Área bajo la curva

$b$ : Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$v_e$ : Volumen de extracción (mL)

$v_m$ : Volumen de extracto cargado en el cartucho OASIS (mL)

$p$ : Peso seco de la muestra (g)

## FICHA TÉCNICA X

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO MEDIANTE UPLC-PDA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico del contenido de ácido gálico cuantificado mediante UPLC-PDA.

**Desarrollo:**

El análisis estadístico se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Se aplicó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados se presentan en la Tabla FTX.1.

**Tabla FTX.1.** Tabla ANOVA para la cuantificación de ácido gálico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	150705	1	15 0705	359,31	0,0000
Intra grupos	1677,73	4	419,43		
Total (Corr.)	152383	5			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de ácido gálico entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95 % de confianza.



## FICHA TÉCNICA XI

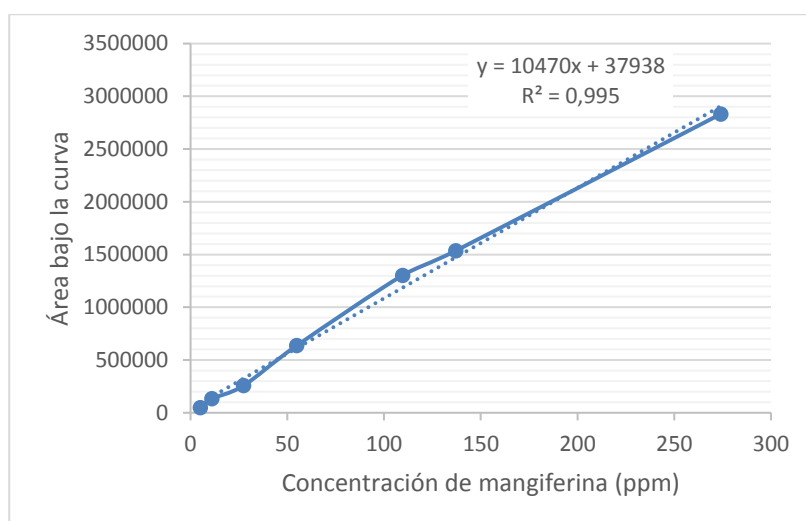
### CUANTIFICACIÓN DE MANGIFERINA MEDIANTE UPLC-DAD

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Cuantificar el contenido de mangiferina en los extractos

**Desarrollo:**

La curva de calibración usada para determinación de la concentración de mangiferina en los extractos se presenta en la Figura FTXI.1.



**Figura FTXI.1** Curva de calibración para determinar el contenido de mangiferina en la muestra

El contenido de mangiferina expresado como mg/100 g base seca se calculó mediante la ecuación FTXI.1

$$\text{Contenido de mangiferina} = \frac{AUC-b}{m} \times \frac{v_e}{v_m \times p \times 10} \quad [\text{FTXI.1}]$$

Donde:

$AUC$ : Área bajo la curva

$b$ : Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$v_e$ : Volumen de extracción (mL)

$v_m$ : Volumen de extracto cargado en el cartucho OASIS (mL)

$p$ : Peso seco de la muestra (g)

## FICHA TÉCNICA XII

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE MANGIFERINA MEDIANTE UPLC-PDA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico del contenido de mangiferina cuantificado mediante UPLC-PDA.

**Desarrollo:**

El análisis estadístico se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Se aplicó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados se presentan en la Tabla FTXII.1.

**Tabla FTXII.1.** Tabla ANOVA para la cuantificación de mangiferina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	141,44	1	141,44	6,10	0,0901
Intra grupos	69,59	3	23,20		
Total (Corr.)	211,03	4			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de mangiferina entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95 % de confianza.

## FICHA TÉCNICA XIII

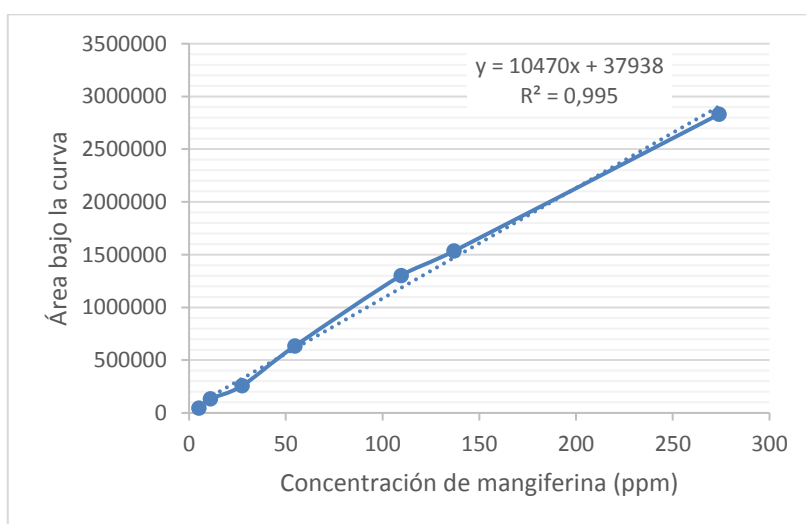
### CUANTIFICACIÓN DE RUTINA MEDIANTE UPLC-PDA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Cuantificar el contenido de rutina en los extractos

**Desarrollo:**

La curva de calibración usada para determinación de la concentración de rutina en los extractos se presenta en la Figura FTXIII.1.



**FTXIII.1** Curva de calibración para determinar el contenido de rutina en la muestra

El contenido de rutina expresado como mg/100 g base seca se calculó mediante la ecuación FTXIII.1

$$\text{Contenido de rutina} = \frac{AUC - b}{m} \times \frac{v_e}{v_m \times p \times 10} \quad [\text{FTXIII.1}]$$

Donde:

*AUC*: Área bajo la curva

*b*: Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para el contenido de rutina

- $m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para el contenido de rutina
- $v_e$ : Volumen de extracción (mL)
- $v_m$ : Volumen de extracto cargado en el cartucho OASIS (mL)
- $p$ : Peso seco de la muestra (g)

## FICHA TÉCNICA XIV

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE RUTINA MEDIANTE UPLC-PDA

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico del contenido de rutina cuantificado mediante UPLC-PDA.

**Desarrollo:**

El análisis estadístico se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Se aplicó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados se presentan en la Tabla FTXIV.1.

**Tabla FTXIV.1.** Tabla ANOVA para la cuantificación de rutina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	142,49	1	142,49	4,04	0,1379
Intra grupos	105,71	3	35,24		
Total (Corr.)	248,20	4			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de rutina entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95 % de confianza.

## FICHA TÉCNICA XV

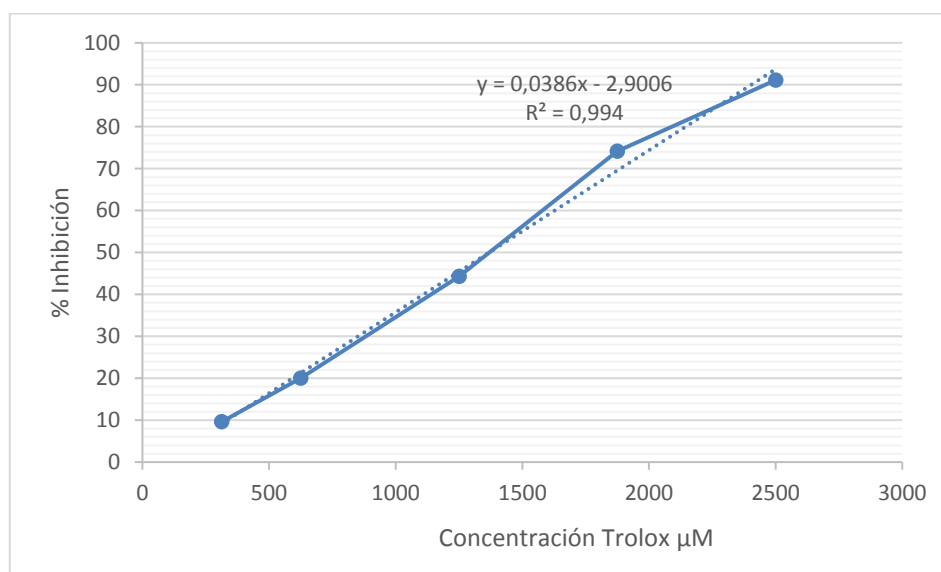
### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO ABTS<sup>+</sup>

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos mediante ensayo ABTS<sup>+</sup>

#### Desarrollo:

Se determinó la actividad antioxidante mediante ensayo ABTS<sup>+</sup> (Re et al., 1999). La curva de calibración usada para la determinación de la actividad antioxidante se presenta en la Figura FTXV.1.



**Figura FTXV.1** Curva de calibración para determinar la actividad antioxidante de la muestra

Para determinar el % de inhibición se utilizó la Ecuación FTXV.1:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100 \quad [\text{FTXV.1}]$$

Donde:

$A_o$ : Absorbancia de la solución de ABTS<sup>+</sup>

$A_f$ : Absorbancia de la mezcla de reacción después de 6 min

Mediante la ecuación FTXV.2 se calculó la actividad antioxidante expresada como mM Trolox/100 g base seca

$$\text{Actividad antioxidante} = \frac{\% \text{ inhibición} - b}{m} \times \frac{fd \times v \times 10}{p} \quad [\text{FTXV.2}]$$

Donde:

$b$ : Ordenada en el origen de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$m$ : Pendiente de la ecuación de la recta para la actividad antioxidante

$fd$ : Factor de dilución

$v$ : Volumen de solvente (l)

$p$ : Peso seco de la muestra (g)



## FICHA TÉCNICA XVI

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO ABTS<sup>+</sup>

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos del ensayo ABTS<sup>+</sup>

**Desarrollo:**

El análisis estadístico se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Se aplicó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados se presentan en la Tabla FTXVI.1.

**Tabla FTXVI.1.** Tabla ANOVA para ensayo ABTS<sup>+</sup>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8,86E4	1	8,88E4	48,98	0,0022
Intra grupos	7,25E3	4	1,81E4		
Total (Corr.)	9,60E4	5			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de CFT entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95 % de confianza.

## FICHA TÉCNICA XVII

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO ORAC

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos mediante ensayo ORAC

**Desarrollo:**

Se determinó la actividad antioxidante mediante ensayo ORAC (Dávalos et al., 2004). Para determinar el área bajo la curva se usó la ecuación FTXVII.1

$$\text{Área bajo la curva} = 1 + \sum_{i=1}^{80} \frac{f_i}{f_o} \quad [\text{FTXVII.1}]$$

Donde:

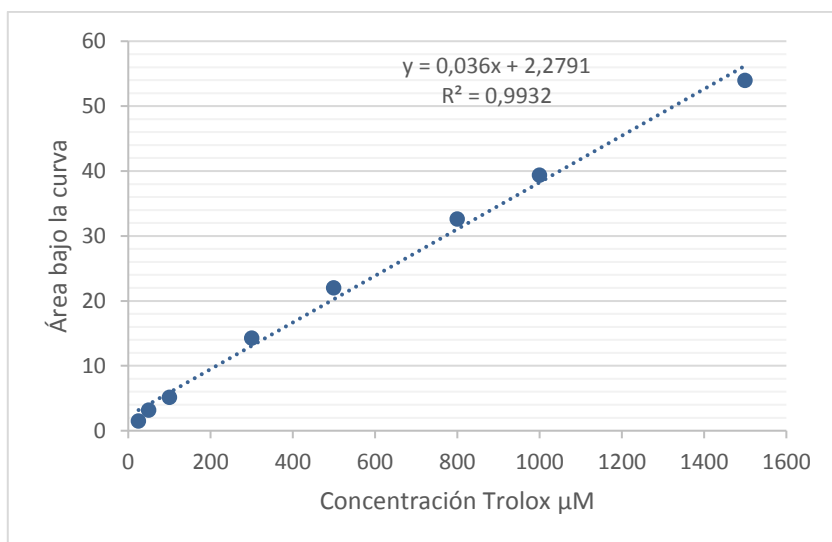
$f_i$ : Fluorescencia inicial (t= 0)

$f_o$ : Fluorescencia obtenida al tiempo t=i (min)

El cálculo del área neta se realizó mediante la ecuación FTXVII.2

$$\text{Área neta} = \text{Área bajo la curva}_{\text{muestra}} - \text{Área bajo la curva}_{\text{blanco}} \quad [\text{FTXVII.2}]$$

Se elaboró una curva de calibración con concentraciones conocidas de Trolox. La curva de calibración usada para la determinación de la actividad antioxidante se presenta en la Figura FTXVII.1.



**FTXVII.1** Curva de calibración para determinar la actividad antioxidante de la muestra mediante ensayo ORAC

## FICHA TÉCNICA XVIII

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO ORAC

**Muestra:** Extractos obtenidos mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos del ensayo ORAC

**Desarrollo:**

El análisis estadístico se realizó en el Software Statgraphics Centurion 18 versión 18.1.14. Se aplicó un análisis ANOVA de una vía. Los resultados se presentan en la Tabla FTXVIII.

**Tabla FTXVIII** Tabla ANOVA para ensayo ORAC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	63,02	1	63,02	0,03	0,8725
Intra grupos	8,62E3	4	2,16E3		
Total (Corr.)	8,69E3	5			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de CFT entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95 % de confianza.

## FICHA TÉCNICA XIX

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE LOS EXTRACTOS FRENTE A *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

**Muestra:** Extractos obtenido mediante extracción asistida por enzimas y extracto obtenido sin aplicación de enzima

**Objetivo:** Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) los extractos

#### Desarrollo:

Se determinó la actividad bacteriostática mediante ensayo de microdilución en placa. Se determinó el % de inhibición mediante la ecuación FTXIX.1.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control \text{ crecimiento}}} \times 100 \quad [\text{FTXIX.1}]$$

Donde:

$Abs_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra medida a 600 nm después de 24 h de incubación

$Abs_{blanco}$ : Absorbancia del correspondiente blanco, medida a 600 nm después de 24 h de incubación

$Abs_{control \text{ de crecimiento}}$ : Absorbancia del correspondiente control de crecimiento, medida a 600 nm después de 24 h de incubación

Los porcentajes de inhibición para cada concentración evaluada se muestran en la tabla FTXIX.1. Se definió CMI como la concentración más baja que inhibe el 90 % del crecimiento. Ninguna concentración evaluada inhibió el 90 % del crecimiento. Ninguna concentración de los extractos inhibió el crecimiento de los microorganismos evaluados.

**Tabla FTXIX** Porcentaje de inhibición frente *E. coli* y *S. aureus*

Concentración del extracto (µg/mL)	% Inhibición frente a <i>E. coli</i>		% Inhibición frente a <i>S. aureus</i>	
	Extracción asistida por enzima	Extracción sin enzima (control)	Extracción asistida por enzima	Extracción sin enzima (control)
2500	21,50 ± 7,58	41,87 ± 3,21	84,94 ± 0,59	97,87 ± 2,92
1250	23,22 ± 2,42	25,97 ± 7,25	75,29 ± 4,80	70,85 ± 0,89
625	15,16 ± 6,38	20,99 ± 3,51	53,06 ± 1,77	52,28 ± 5,00
312,50	9,95 ± 2,79	21,65 ± 4,45	19,90 ± 2,81	55,59 ± 2,81
156,25	9,34 ± 3,66	23,01 ± 3,63	22,00 ± 4,14	24,20 ± 0,53
78,13	4,29 ± 5,11	11,80 ± 3,58	11,38 ± 0,84	23,09 ± 0,71
39,06	6,09 ± 1,04	13,21 ± 3,44	13,77 ± 2,61	22,22 ± 1,95
19,53	1,13 ± 2,86	8,51 ± 5,77	7,90 ± 0,86	17,19 ± 2,21

## FICHA TÉCNICA XX

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ANTIBIÓTICO DE REFERENCIA FRENTE A *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

**Muestra:** Antibiótico ampicilina (GENFAR)

**Objetivo:** Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico de referencia

**Desarrollo:**

Se determinó la actividad bacteriostática mediante ensayo de microdilución en placa (CLSI, 2015). Se determinó el % de inhibición mediante la ecuación FTXX.1.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control \text{ crecimiento}}} \times 100 \quad [\text{FTXX.1}]$$

Donde:

$Abs_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra medida a 600 nm después de 24 h de incubación

$Abs_{blanco}$ : Absorbancia del correspondiente blanco, medida a 600 nm después de 24 h de incubación

$Abs_{control \text{ de crecimiento}}$ : Absorbancia del correspondiente control de crecimiento, medida a 600 nm después de 24 h de incubación

Los porcentajes de inhibición para cada concentración evaluada se muestran en la tabla FTXX.1. Se definió CMI como la concentración más baja que inhibe el 90 % del crecimiento. La CMI de ampicilina frente a *E. coli* fue 78,13 µg/mL.

**Tabla FTXX** Porcentaje de inhibición frente *E. coli* y *S. aureus*

<b>Concentración del extracto (µg/mL)</b>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
2 500	99,25 ± 0,18	98,63 ± 1,12
1 250	100,42 ± 0,08	101,48 ± 0,41
625	99,63 ± 0,27	99,33 ± 1,62
312,50	101,05 ± 0,10	99,20 ± 2,89
156,25	97,29 ± 3,73	102,03 ± 0,98
78,13	88,27 ± 5,71	100,20 ± 0,31
39,06	15,15 ± 5,10	99,80 ± 0,23
19,53	3,69 ± 2,29	100,56 ± 1,51