

UNIVERSIDAD DE CUENCA



Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**“Optimización experimental de un método cromatográfico HPLC-DAD
para el análisis de polifenoles en frutas.”**

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de

Bioquímico Farmacéutico

Autor:

Jorge Eduardo Saquicela Carpio

CI.: 0105501746

Directora:

Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa, PhD.

CI.: 0301082897

CUENCA –ECUADOR

2018



RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue desarrollar y optimizar un método de HPLC-DAD para el análisis de polifenoles en frutas.

Para los experimentos se utilizaron estándares de nueve compuestos fenólicos, se realizaron pruebas iniciales aplicando condiciones obtenidas de publicaciones científicas. La optimización del método se llevó a cabo mediante el uso de un diseño factorial, seguido de un diseño central compuesto y de un test de deseabilidad para determinar la influencia de las variables velocidad de flujo, temperatura de columna y acidificación de la fase móvil en la variable respuesta eficiencia. A través de las pruebas de optimización, se determinaron las condiciones cromatográficas óptimas propuestas por los modelos. Posteriormente, se aplicó el método analítico optimizado en muestras de mango liofilizadas extraídas por un método desarrollado previa revisión bibliográfica.

En el diseño factorial, se observó un bajo ajuste del modelo siendo la variable acidificación de fase móvil no significativa. Existió una mejora de ajuste con el diseño central compuesto. Se demostró una influencia heterogénea de las variables analizadas sobre la eficiencia cromatográfica. La prueba de deseabilidad propuso las condiciones óptimas de 0.64 mL/min para el flujo y 29.1°C para la temperatura de columna, esta propuesta fue de poca aplicabilidad por razones prácticas. Finalmente, se obtuvo un método de 43.5 min a las longitudes de onda óptimas de 254, 280 y 320 nm. Se obtuvieron cromatogramas con picos resueltos para las muestras de mango con una variación aceptable (4.4 - 7.6 %CV), denotando la aplicabilidad del método optimizado y la utilidad del método de extracción. En las muestras se logró identificar y cuantificar 4 de 9 compuestos fenólicos analizados. Por otro lado, se observó la necesidad de corroboración de recuperación y de aplicación del método en otras matrices.

PALABRAS CLAVES: HPLC-DAD, polifenoles, optimización, diseño factorial, diseño central compuesto, extracción, mango.



ABSTRACT

The aim of the present study was to develop and optimize a HPLC-DAD method for the analysis of polyphenols in fruits.

For the experiments, standards of nine phenolic compounds were used, initial runs were performed with conditions based on scientific papers. Method optimization was carried out by using a factorial design, followed by a central composite design and a desirability test to determine the influence of the variables flow rate, column temperature and acidification of the mobile phase on the response variable efficiency. Through the optimization tests, the optimal chromatographic conditions proposed by the models were determined. Next, the optimized analytical method was applied on lyophilized mango samples extracted by a method developed utilizing literature review.

In the factorial design, a low adjustment of the model was observed and the variable acidification of the mobile phase was not significant. There was an adjustment improvement with the composite central design. A heterogeneous influence of the variables analyzed on the chromatographic efficiency was demonstrated. The desirability test proposed the optimal conditions of 0.64 mL / min for the flow rate and 29.1°C for the column temperature, this proposal was of little applicability for practical reasons. At last, a final method of 43.5 min was obtained at the optimal wavelengths of 254, 280 and 320 nm. Chromatograms with resolved peaks were obtained for mango samples with an acceptable variation (4.4 - 7.6% CV), denoting the applicability of the optimized method and the utility of the extraction method. In the samples, 4 out of 9 phenolic compounds analyzed were identified and quantified. On the other hand, the need for corroboration of analytical recovery and application of the method in other matrices was observed.

KEYWORDS: HPLC-DAD, polyphenols, optimization, factorial design, central composite design, extraction, mango.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Polifenoles	4
1.2. Biosíntesis de polifenoles	4
1.3 Clasificación de los polifenoles	9
1.3.1. Clasificación según la estructura de los polifenoles	10
1.4. Variabilidad de polifenoles en plantas y factores influyentes	12
1.5. Polifenoles en alimentos	12
1.6. Análisis de polifenoles	13
1.6.1. Métodos no cromatográficos	13
1.6.2. Métodos cromatográficos	13
1.7. Desarrollo y optimización de un método cromatográfico	15
1.7.1. Optimización en HPLC	15
1.7.2. Eficiencia y resolución cromatográfica	16
1.8. Extracción de polifenoles	17
1.8.1. Métodos de extracción de polifenoles	18
1.9. Diseños experimentales y optimización	19
1.9.1. Diseño factorial.....	20
1.9.2. Metodología de superficie de respuesta.....	21
2. METODOLOGÍA.....	22
2.1. Diseño y tipo de investigación	22
2.2. Muestreo	22
2.3. Análisis de muestras.....	22



2.3.1. Equipos, reactivos y materiales.....	22
2.4. Métodos analíticos	23
2.4.1. Preparación de estándares	23
2.4.2. Condiciones cromatográficas para las corridas iniciales	23
2.4.3. Optimización experimental factorial.....	24
2.4.4. Optimización experimental: diseño central compuesto	26
2.4.5. Optimización multirespuesta: pruebas de deseabilidad	28
2.5. Extracción de polifenoles	29
2.5.1. Selección de los estudios	29
2.6. Aplicación del método analítico optimizado	30
2.7. Análisis estadístico	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1. Pruebas preliminares	32
3.2. Diseño factorial	33
3.3. Diseño central compuesto (CCD)	38
3.4. Optimización multirespuesta: pruebas de deseabilidad.....	42
3.5. Método de extracción de polifenoles.....	46
3.6. Aplicación del método optimizado	48
3.6.1. Descripción del método final y parámetros analíticos	48
3.6.2. Aplicabilidad de método: análisis de polifenoles en extractos de mango	53
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
4.1. Conclusiones	56
4.2. Recomendaciones	57
REFERENCIAS.....	58



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo en plantas para la generación de compuestos fenólicos.....	11
Figura 2. Vía general de los fenilpropanoides.....	12
Figura 3. Síntesis de cumarina y furanocumarina.....	12
Figura 4. Síntesis de flavonona y estilbeno del ácido cumárico y malónico...	13
Figura 5. Relación estructural entre las subclases de flavonoides.....	14
Figura 6. Vía simplificada de la síntesis de polifenoles.....	15
Figura 7. Clases principales de polifenoles en base a su estructura.....	16
Figura 8. Gradiente de fase móvil en relación con el tiempo para corridas iniciales.....	30
Figura 9. Esquema de la revisión bibliográfica para la extracción de los polifenoles en frutas.....	36
Figura 10. Diagrama de Pareto del diseño factorial para los estándares de polifenoles estudiados.....	43
Figura 11. Cromatogramas obtenidos de los estándares a 1 ppm con las condiciones propuestas por el test de deseabilidad.....	50
Figura 12. Cromatogramas obtenidos de los estándares a 1ppm usando el punto central del CCD.....	51
Figura 13. Gradiente de fase móvil del método final.....	54



Figura 14. Curvas de calibración de estándares con ecuación de la curva y R^2 57

Figura 15. Cromatogramas obtenidos del mango..... 59

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Cantidad de anillos fenólicos de los compuestos fenólico y ejemplos de subclases en diferentes alimentos de origen vegetal.....	17
Tabla 2. Denotación y niveles de las variables dependientes del diseño factorial.....	31
Tabla 3. Diseño matemático factorial.....	31
Tabla 4. Denotación y niveles de las variables dependientes del CCD.....	33
Tabla 5. Diseño matemático del CCD.....	33
Tabla 6. Criterios para determinar puntuación para punto R.....	34
Tabla 7. Tiempos de retención y longitudes de onda de los estándares de polifenoles en las corridas iniciales.....	38
Tabla 8. Eficiencia cromatográfica para los estándares bajo las condiciones del diseño factorial.....	40
Tabla 9. Valores de R^2 ajustado y efectos según ANOVA y mejor ANOVA para las variables de experimentación del modelo factorial.....	42
Tabla 10. Eficiencia de los estándares en el diseño central compuesto.....	45
Tabla 11. Valores de R^2 y valores P para el modelo CCD para la parte factorial lineal y la parte cuadrática (RSM).....	46
Tabla 12. Puntos estacionarios propuestos por el modelo mejor ajustado...	47
Tabla 13. Valores propuestos por test de deseabilidad.....	49
Tabla 14. Tiempo de retención de los estándares.....	55
Tabla 15. Parámetros de optimización del método analítico de polifenoles.	56
Tabla 16. Cuantificación de polifenoles en mango.....	59

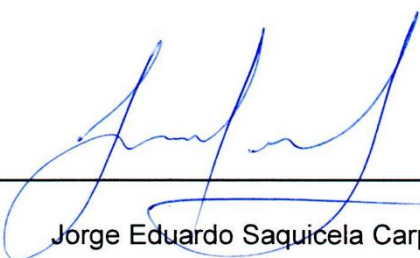


Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio
Institucional

Jorge Eduardo Saquicela Carpio, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Optimización experimental de un método cromatográfico HPLC-DAD para el análisis de polifenoles en frutas**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 27 de junio de 2018



Jorge Eduardo Saquicela Carpio

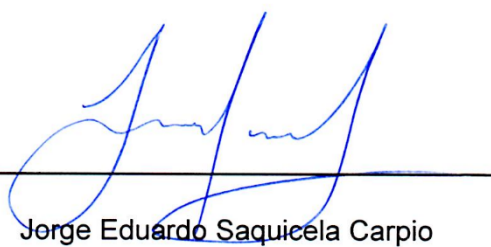
C.I: 0105501746



Cláusula de propiedad intelectual

Jorge Eduardo Saquicela Carpio, autor del trabajo de titulación "**Optimización experimental de un método cromatográfico HPLC-DAD para el análisis de polifenoles en frutas**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 27 de junio de 2018



Jorge Eduardo Saquicela Carpio

C.I: 0105501746



Dedicatoria

A mis sobrinos Paula, María Paz, Adrián, Joaquín, Emilia y José Daniel, por darme la fortaleza para cumplir todos mis objetivos académicos y personales. Sin su alegría, amor, confianza, locura y ternura, nada fuera igual.

A mi madre, por cuidar incondicionalmente de mí, por ayudar a desarrollarme académica y profesionalmente, y por enseñarme desde pequeño que la educación es una parte fundamental de la vida.

Jorge Eduardo Saquicela Carpio



Agradecimientos

Quiero agradecer de manera muy comedida a la Dra. Johana Ortiz por ser mi tutora. Su tiempo, apoyo, dedicación y sabiduría, no sólo hizo que esta investigación haya sido posible, sino que me hizo crecer como profesional y como persona. Mis datos son sus datos. Le agradezco por corregirme con especial cariño los errores de la tesis y por enseñarme que hay más conectores que “además” y “sin embargo”. Además, quiero agradecer el tiempo que se tomó para instruirme en el uso del HPLC, esto aseguró que no dañe el equipo y me endeude. Por los tiempos en los que el diclorometano nos afectó. Y por las charlas educativas y no tan educativas con café en la mano. Finalmente, le agradezco por creer en mí.

De mismo modo, agradecimientos a mi bella madre por facilitarme el transporte, la alimentación y la vivienda. Sé que no es fácil tratar conmigo cuando estoy estresado, pero lo hemos conseguido.

Agradezco al Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca por permitir el uso de sus equipos y de sus estándares de polifenoles para el desarrollo de la tesis. Por otro lado, estoy muy seguro de que el metanol hizo que pierda un poco más mi vista.

Igualmente agradecimientos a mis amigos dentro y fuera de la universidad por siempre estar ahí para celebrar y/o para aconsejar.

Finalmente quisiera agradecer a mis compañeras de trabajo y/o jefas Michelle, Gabriela y Johana por darme su apoyo para comenzar mi trayectoria profesional y por su amistad en los momentos lindos y difíciles. A Michelle por enseñarme que cada cosa en su lugar y sus palabras de poder, a Gabriela por mostrarme que se puede ser investigador y aparte una persona de familia. A las tres por siempre hacerme pensar y sonreír.

Jorge Eduardo Saquicela Carpio



INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son compuestos bioactivos que se encuentran en las frutas y en otras partes aéreas de las plantas. A nivel mundial, ha existido un creciente interés en el estudio de estos compuestos fenólicos en alimentos debido a sus propiedades promotoras de la salud (Masibo & He, 2008). Entre estas propiedades se cita la actividad antioxidante, anticarcinogénica, antiateroesclerótica y antimutagénica (Baruah, 2011; Masibo & He, 2008).

A pesar de existir una enorme diversidad de frutas en el Ecuador, existen limitadas investigaciones en cuanto a la caracterización de la composición de polifenoles. Esto consecuentemente resulta en el retraso en el diseño y desarrollo de productos alimenticios a partir de estas frutas con capacidades antioxidantes, que pueden llegar a ser muy útiles en el combate contra el estrés oxidativo (Chicaiza Guamán, 2015). Por otro lado, existe una variedad de métodos para el estudio de polifenoles en base a diferente instrumentación. Existen métodos bastante simples como la cromatografía de capa fina, reacciones de óxido reducción, reacciones de precipitación radial, y espectrofotometría para determinar relativamente la cantidad de polifenoles totales o de especies fenólicas específicas. Para la elucidación estructural de estos compuestos se requiere de técnicas más complejas como la cromatografía líquida de alta resolución o de ultra alta resolución, espectrometría de masas, infrarrojo y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Ricco, Agudelo, & Wagner, 2015). La cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), la cromatografía de gases (GC), o sus combinaciones con la espectrometría de masas son los métodos más comunes aplicados para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. En los últimos 10 años, se ha optado por métodos de cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas (Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

Las observaciones anteriores señalan la necesidad de desarrollar de un método instrumental para análisis de polifenoles en frutas. A pesar de que la metodología predilecta es la cromatografía líquida de ultra alta resolución



(UHPLC), por el requerimiento de trabajo en un laboratorio de menor complejidad, se ha optado por trabajar con cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para desarrollar un método optimizado de análisis.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y optimizar un método de cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para el análisis de polifenoles en frutas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Optimizar el método cromatográfico por HPLC-DAD para la correcta separación y caracterización de polifenoles en matrices de frutas.
2. Desarrollar un método de extracción de polifenoles a partir de frutas en base a revisión bibliográfica.
3. Aplicar el método optimizado por HPLC-DAD para evaluar el contenido de polifenoles en muestras liofilizadas de mango.



1. MARCO TEÓRICO

1.1. Polifenoles

Los polifenoles, conocidos también como compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios de las plantas que contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos en su estructura; pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, moléculas con un anillo fenólico, como los ácidos y alcoholes fenólicos, entre otros (del Cornò, Scazzocchio, Masella, & Gessani, 2016). En base a estas modificaciones estructurales, varían sus propiedades funcionales y fisicoquímicas (Masibo & He, 2008).

1.2. Biosíntesis de polifenoles

El metabolismo de las plantas está constituido por las vías primarias, que se encuentran en todas las células y manipulan un grupo uniforme de compuestos básicos; y por las vías secundarias, que se hallan en células especializadas y manejan una variedad grande de compuestos únicos. Las vías primarias metabolizan carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos a través de reacciones de glicólisis, ciclo del ácido tricarboxílico, derivación de la pentosa fosfato y biosíntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En contraste, los metabolitos secundarios (como alcaloides, flavonoides, taninos, estilbenos, terpenos, y compuestos derivados) son producidos por las vías del ácido shikímico, malónico, mevalónico y del fosfato metileritritol (Figura 1) (Saltveit, 2017).

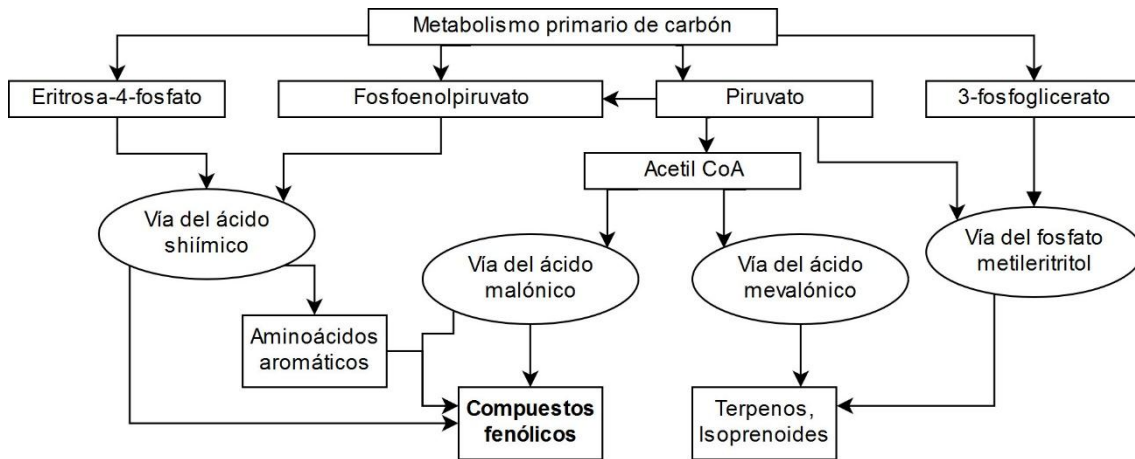


Figura 1. Metabolismo en plantas para la generación de compuestos fenólicos.

Fuente: (Saltveit, 2017).

La adición de un grupo hidroxilo a un anillo benceno forma un fenol, el cual es base de compuestos fenólicos subsecuentes. Los carbohidratos simples son convertidos a los aminoácidos fenilalanina y a tirosina por medio de la ruta del ácido shikímico. Muchos de los compuestos secundarios fenólicos son derivados de estos aminoácidos, denominados fenilpropanoides y constituyen los ácidos fenólicos. Estos se diferencian por reacciones de metilación, hidroxilación, esterificación, ciclación, entre otras (Figura 2) (Annie Ewané, Lepoivre, de Bellaire, & Lassois, 2013; Evans, Evans, & Trease, 2009).

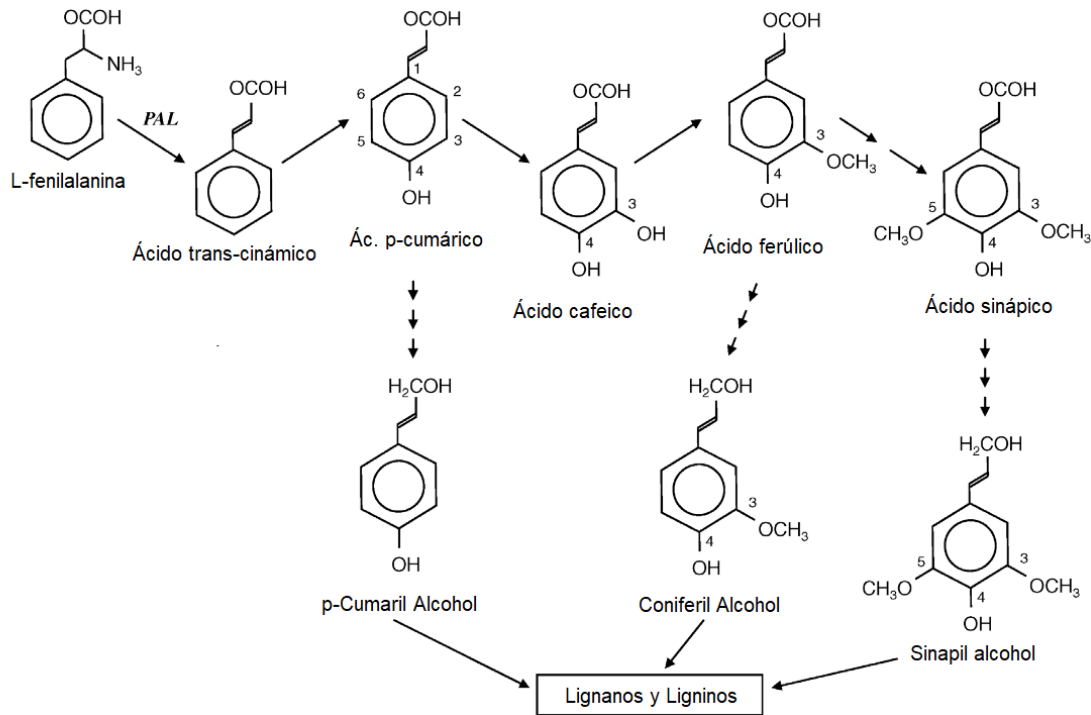


Figura 2. Ruta general de los fenilpropanoides. *Fuente:* (Evans et al., 2009; Saltveit, 2017).

Las cumarinas resultan de la formación de ésteres cíclicos a partir del ácido cumárico (Figura 3). Igualmente, cuando este ácido se condensa con tres ácidos malónicos, que provienen de la vía del mismo nombre, se forman las flavononas (un tipo de flavonoide) y los estilbenos (Figura 4). Modificaciones en los anillos de los flavonoides, generalmente reacciones de oxidación, crean las distintas subclases que existen (Figura 5) (Annie Ewané et al., 2013; Saltveit, 2017).

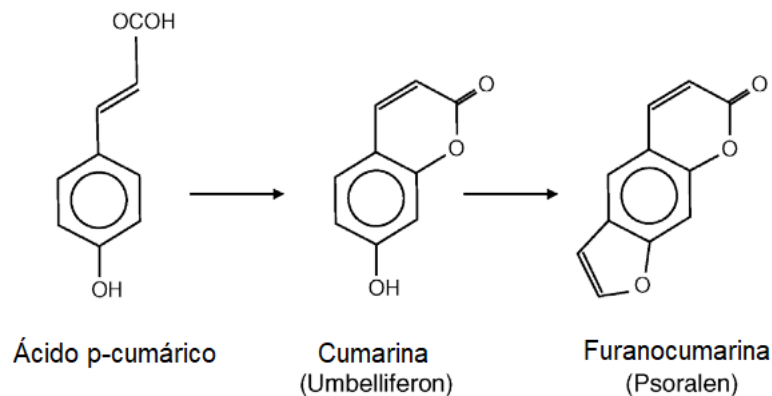


Figura 3. Síntesis de cumarina y furanocumarina. *Fuente:* (Saltveit, 2017).

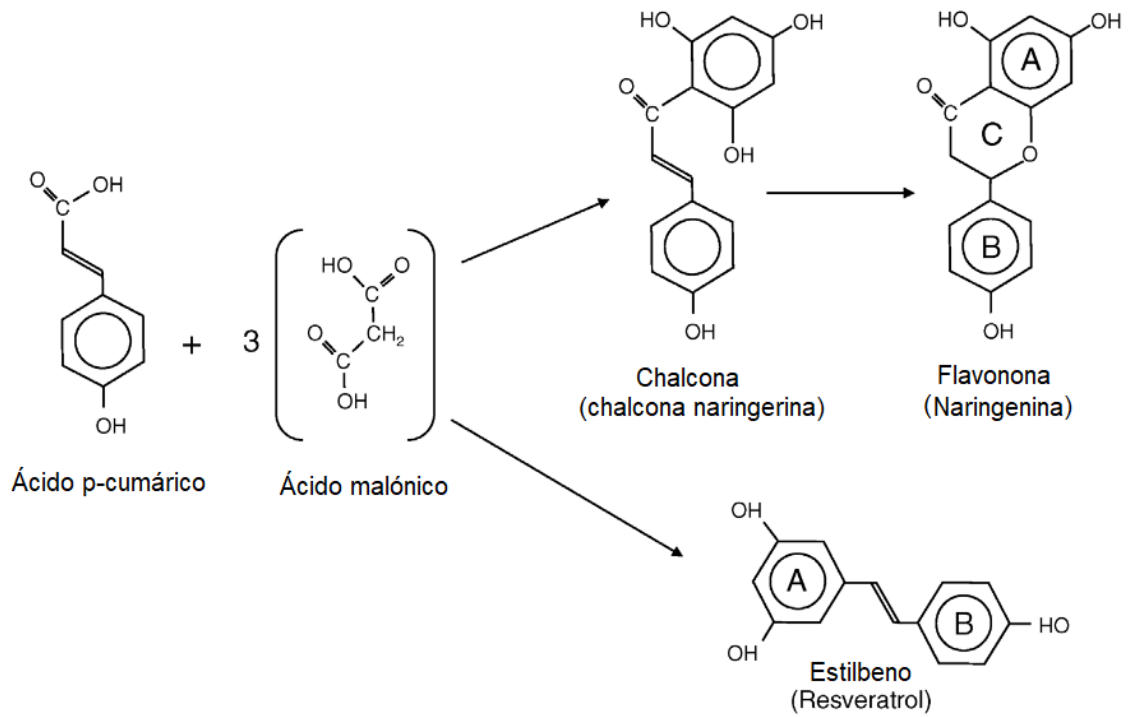


Figura 4. Síntesis de flavonona y estilbeno del ácido cumárico y malónico. *Fuente:* (Saltveit, 2017).

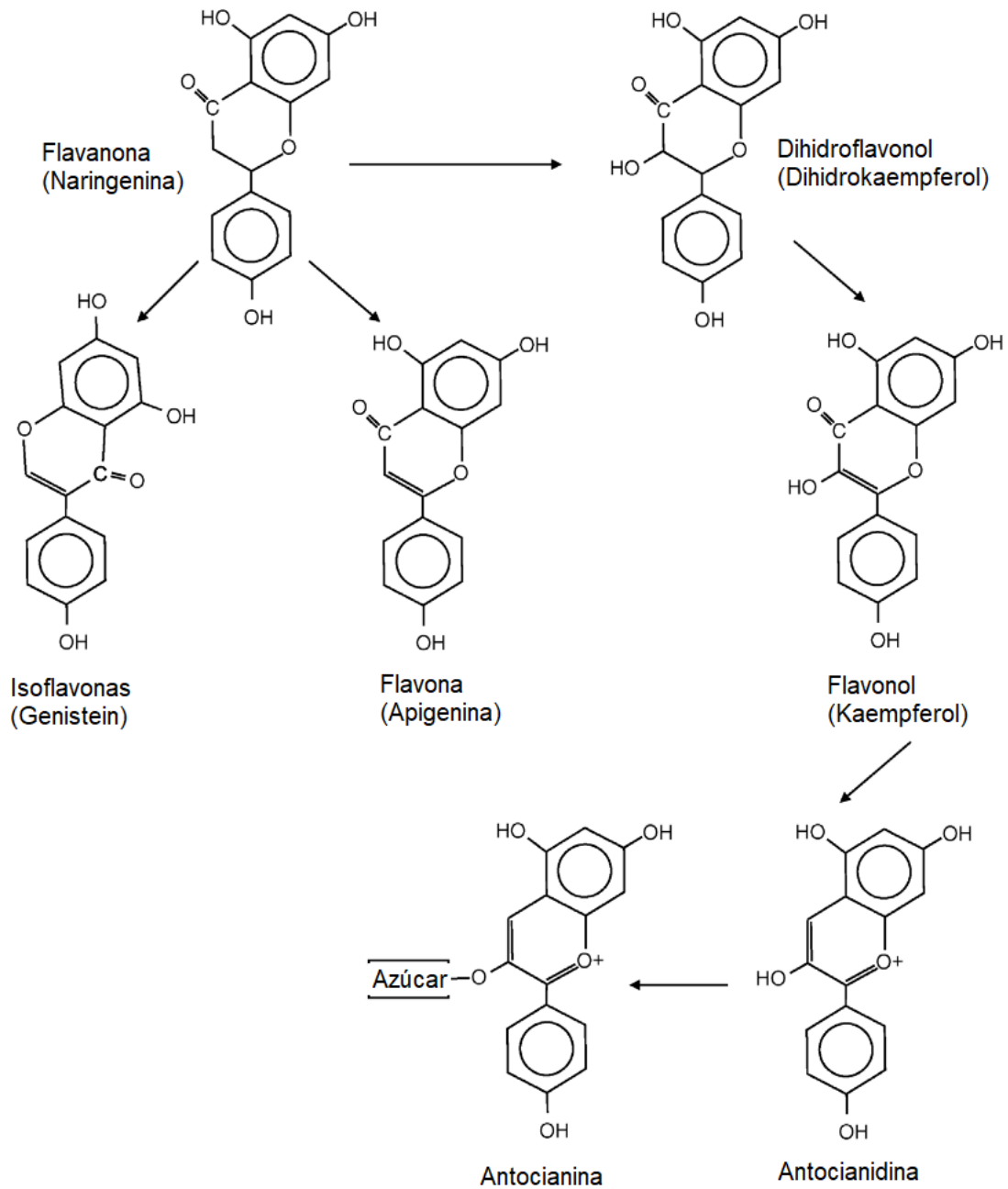


Figura 5. Relación estructural entre las subclases de flavonoides. *Fuente: (Saltveit, 2017).*

Las reacciones de condensación también juegan un papel fundamental en la síntesis de polifenoles. La unión de unidades de flavonoides forma los taninos condensados; mientras que los taninos hidrolizables o solubles se forman por la polimerización de ácidos fenólicos (especialmente ácido gálico) y azúcares simples.

Así, por un sinnúmero de reacciones enzimáticas diversas se crean una diversidad inmensa de polifenoles (Annie Ewané et al., 2013; Saltveit, 2017). De manera muy simplificada la síntesis y relación estructural de estas moléculas se muestra en la Figura 6. Cabe mencionar que los polifenoles poseen varias vías metabólicas posibles que no se encuentran, por el momento, completamente elucidadas.

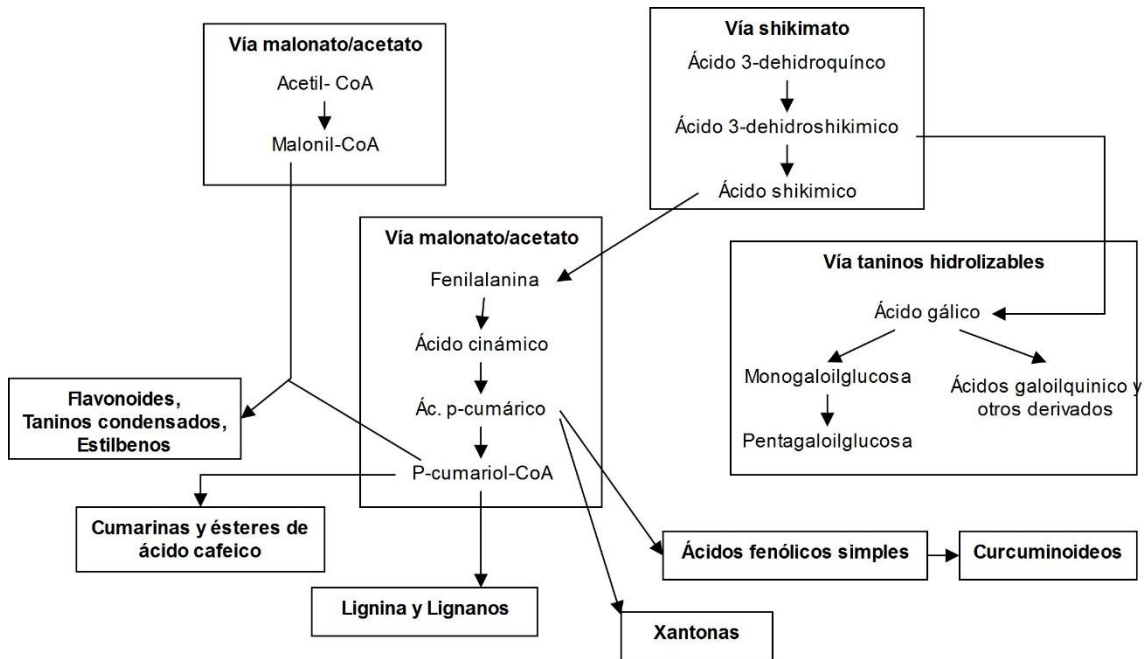


Figura 6. Vía simplificada de la síntesis de polifenoles. Fuente: (Annie Ewané et al., 2013; Evans et al., 2009; Saltveit, 2017).

1.3 Clasificación de los polifenoles

Los polifenoles, al constituir uno de los grupos más numerosos de productos naturales en el reino vegetal con más de 10000 compuestos conocidos, pueden ser categorizados de diferentes maneras considerando su origen, su función biológica o su estructura química basado en la cantidad de anillos fenólicos que contienen (Tsao, 2010).

En particular, las diferencias entre polifenoles en cuanto al número de grupos fenólicos, carbonos, grupos hidroxilo y demás radicales en su composición, cambian las propiedades fisicoquímicas y funcionales de cada uno de sus subgrupos. Por ejemplo, las xantonas tienen una capacidad antioxidante dos a

tres veces mayor a la de un ácido fenólico (Palafox-Carlos, Yahia, & González-Aguilar, 2012).

1.3.1. Clasificación según la estructura de los polifenoles

En cuanto a su estructura, esta clasificación es de alta diversidad y contiene varios subgrupos, que a su vez pueden tener derivados aún más complejos (Figura 7). La cantidad de carbonos de los anillos fenólicos de cada uno de los subgrupos se presentan en la Tabla 1.

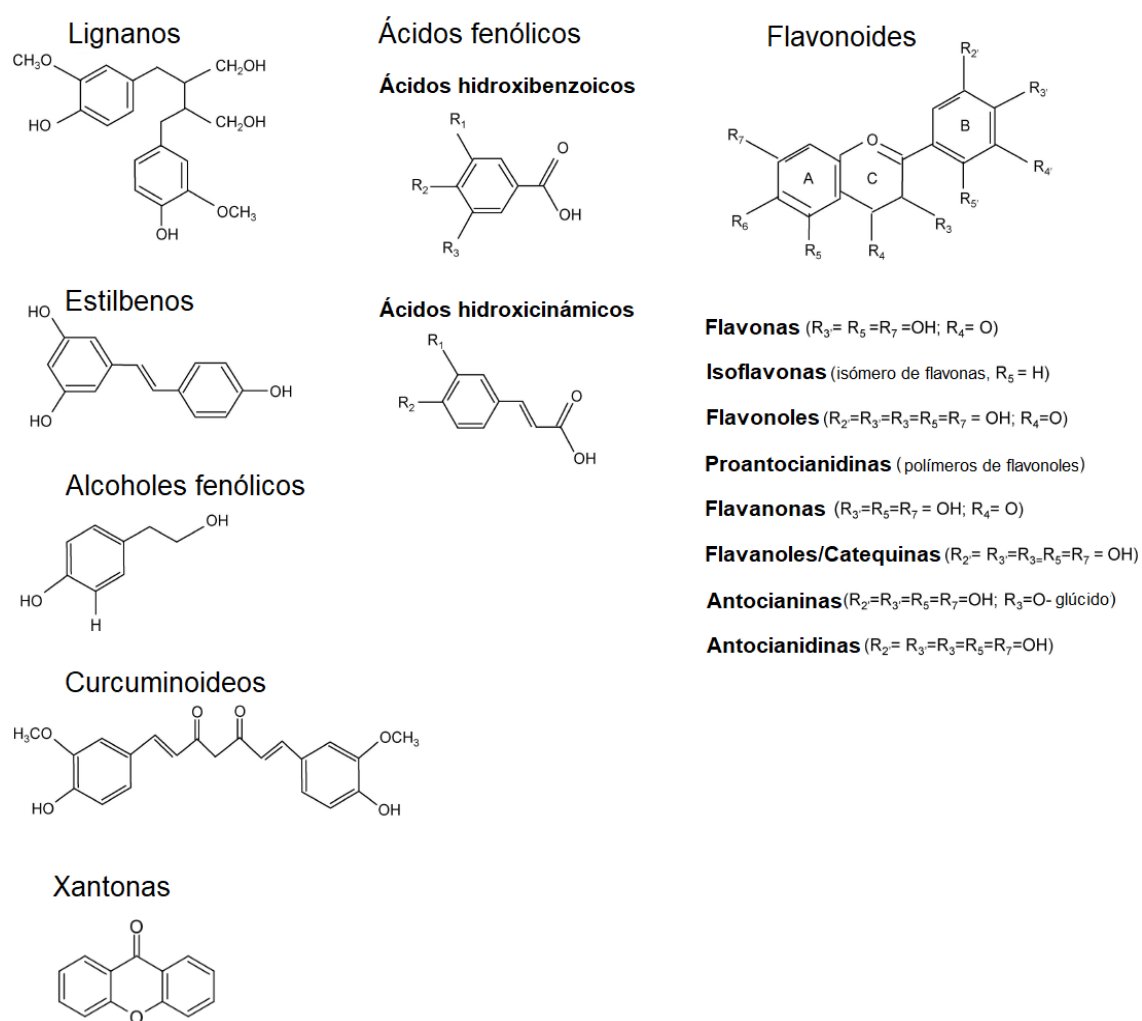


Figura 7. Clases principales de polifenoles en base a su estructura. Fuente: (del Cornò et al., 2016).

Clasificación	Subclasificación	Estructura de esqueleto	Ejemplos	Alimentos
Flavonoides	Flavonoles	C6-C3-C6	Quercetina, rutina, kaempferol	Cocoa, frutas, vegetales, especias
	Antocianidinas		Cianidina, malvidina	Moras, frutillas, vino
	Flavonas		Luteolina, apigenina	Hierbas (orégano), aceite de oliva
	Flavanona		Hesperidina, sakuranina	Frutas, jugos cítricos, tomates
	Isoflavonas		Genisteina, daidzeina	Soya y derivados de soya
No flavonoides	Flavanoles Catequinas		Catequina, epicatequina, epigallocatequina	Uvas, cocoa, té, vino
	Ácidos fenólicos benzoicos	C6-C1	Gálico, vanílico, hidroxibenzoico	Frutas, especias, cocoa
	Ácidos fenólicos cinámicos	C6-C3	Caféico, clorogénico, ferúlico	Vegetales, nueces, especias
	Alcoholes fenólicos	C6-C2	Hidroxitirosol	Aceites, aceite de oliva
	Lignanós	(C6-C3) ₂	Matairesinol, secoisalariciresinol	Linaza
	Estilbenos	C6-C2-C6	Resveratrol	Uvas, vino
	Curcuminoideos	C6-C7-C6	Curcumina, demetoxicurcumina	Cúrcuma
Xantonas	C6-C1-C6	Mangiferina, mangostina	Mango	

Tabla 1. Cantidad de anillos fenólicos de los compuestos fenólico y ejemplos de subclases en diferentes alimentos de origen vegetal. *Fuente:* (del Cornò et al., 2016; Haminiuk, Maciel, Plata-Oviedo, & Peralta, 2012).

1.4. Variabilidad de polifenoles en plantas y factores influyentes

En las plantas, los compuestos fenólicos varían considerablemente de manera cualitativa y cuantitativa entre especies y entre individuos de la misma especie. Algunos compuestos son ubicuos (como el ácido hidroxicinámico), otros son comunes (como las antocianinas) y otros son específicos de ciertas familias o especies (como los isoflavonoides). Aparte de la variedad de planta, factores externos y endógenos pueden influenciar el nivel de contenido fenólico antes y después de la cosecha. Entre estos factores, se mencionan temperatura, luz, humedad, almacenamiento, microorganismos, insectos y muchos otros (Annie Ewané et al., 2013; Evans et al., 2009; Tsao, 2010).

Además, los compuestos fenólicos son muy variables y su presencia y cantidad depende de la especie e individualidad de planta, así como también según la parte de la planta que se analiza (Masibo & He, 2008).

1.5. Polifenoles en alimentos

Las frutas y las verduras son componentes esenciales de una dieta saludable, y un consumo diario suficiente podría contribuir a la prevención de enfermedades importantes (OMS, 2012). Esto se le atribuye a la composición química de dichos alimentos, especialmente a su capacidad antioxidante por su composición rica en polifenoles y otros compuestos bioactivos (Yahia, 2017). De todos estos metabolitos secundarios, los flavonoides son los compuestos con mayor presencia en las frutas y representan aproximadamente dos tercios de los polifenoles dietarios, siendo seguidos por los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) (Haminiuk et al., 2012). En la Tabla 1 se enlistan ejemplos de alimentos para las subclases de polifenoles.



1.6. Análisis de polifenoles

A pesar de existir varias investigaciones, el análisis de compuestos fenólicos continúa siendo un reto por su gran diversidad estructural. Por lo tanto, existe una gran variedad de métodos cualitativos y cuantitativos de acuerdo con el grupo de compuestos fenólicos.

1.6.1. Métodos no cromatográficos

Los ensayos espectrofotométricos, como los métodos Folin-Denis y Folin-Ciocalteu, se han usado por muchos años para cuantificar los compuestos fenólicos totales. Estos métodos se basan en reacciones de reducción cuyos productos resultantes tienen un color azul con una absorbancia medible alrededor de los 760 nm. De manera similar, se usan otros tipos de reacciones para diversos grupos de compuestos fenólicos para ser medidos por espectrofotometría. La desventaja de los métodos espectrofotométricos es que no son específicos para especies fenólicas pues pueden reaccionar con azúcares, aminas aromáticas y otros compuestos (Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

1.6.2. Métodos cromatográficos

La cromatografía es un método de separación de mezclas complejas en base a la afinidad de los analitos entre dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil. La fase estacionaria (por ejemplo, una columna con relleno de una sustancia sólida inerte finamente dividida como el siloxano) es la que retiene a la muestra, y la fase móvil es el fluido en movimiento que arrastra a la muestra a través del lecho estacionario. Los componentes más afines a la fase estacionaria serán más retenidos; mientras que, los más afines a la fase móvil tendrán el efecto opuesto. La cromatografía se utiliza con fines de separación de componentes de la muestra o puede ser usado como un método en sí, para determinar dichos componentes, si se lo asocia con un detector adecuado (Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997).



La cromatografía en papel y cromatografía en capa fina han sido utilizadas con fines cualitativos en compuestos fenólicos. Estas técnicas usan eluyentes para que las moléculas recorran sobre un papel tipo Whatman o placas de sílica gel en base a su polaridad y peso molecular, se realizan revelados y mediciones del factor de retención de cada uno de los compuestos (Ricco, Agudelo, & Wagner, 2015; Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997). Estas técnicas se utilizan en la actualidad como pruebas iniciales de caracterización.

La cromatografía de gases es aplicada en la caracterización y cuantificación de polifenoles, principalmente para el estudio de flavonoides, taninos y ácidos fenólicos. El reto más grande en este tipo de análisis es la derivatización de los distintos compuestos para volverlos más volátiles. Estos pasos para la modificación química de los compuestos fenólicos son generalmente tediosos y pueden afectar significativamente a la matriz del alimento (Ricco et al., 2015).

La técnica adecuada para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) que se caracteriza por alcanzar altas presiones de trabajo. Varios factores afectan el análisis por HPLC como la extracción y purificación de la muestra, composición de las fases móviles, tipos de columna y detectores. Esta técnica permite desarrollar métodos analíticos sensibles y relativamente rápidos (Nollet & Toldrá, 2013; Ricco et al., 2015).

Generalmente, para el análisis de polifenoles se usa cromatografía de fase inversa con columnas C18, con elución de gradiente, acoplado a un detector de arreglo de diodos (PDA o DAD por sus siglas en inglés) (Chicaiza Guamán, 2015; Khoddami et al., 2013; Nollet & Toldrá, 2013). En los últimos 10 años, se ha preferido el uso de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC por sus siglas en inglés) que utiliza presiones aún mayores, reduciendo sustancialmente el tiempo de análisis. Para una elucidación estructural completa puede usarse técnicas de espectrometría de masas o espectroscopía de resonancia magnética nuclear, siendo la primera la más común. Para estas técnicas más complejas, se requiere el aislamiento previo del analito (Khoddami et al., 2013; Ricco et al., 2015).



El detector de arreglo de diodos se prefiere a otros detectores pues puede escanear un rango de todas las longitudes de ondas probables. Para el caso de polifenoles, este escaneado simultáneo puede realizarse en el espectro UV entre los 200 y 500 nm aproximadamente (Gómez-Caravaca, López-Cobo, Verardo, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2016; Ricco et al., 2015).

1.7. Desarrollo y optimización de un método cromatográfico

El desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta resolución comprende varios pasos que deben llevarse a cabo de manera adecuada para obtener un método que sea de utilidad. Estos pasos incluyen el tratamiento de la muestra, detección de bandas, selección de condiciones de separación, la cuantificación y la validación del método (Bliesner, 2006; Snyder et al., 1997).

La razón del análisis y la información de la muestra y de los estándares a analizar constituyen la base al momento de escoger y desarrollar un método analítico. Además, se debe evaluar la necesidad de un proceso especial y del pre-tratamiento de la muestra, así como también la selección y configuración del detector para obtener los resultados requeridos. Por lo general, las primeras corridas sirven para estimar las mejores consideraciones de separación en base a los parámetros cromatográficos, para luego optimizar éstos y obtener cromatogramas de alta resolución (Bliesner, 2006).

1.7.1. Optimización en HPLC

Previo a la optimización, se necesitan definir el objetivo del análisis cromatográfico. Es decir, se puede separar mejor o aumentar la resolución, separar más rápido o disminuir el tiempo de retención, separar con mayor sensibilidad o disminuir el límite de detección, o separar a menor costo (Kromidas, 2006).

En primera instancia, se consideran condiciones que no son modificables de manera posterior, como el equipo que se usa para el análisis. Se debe aprovechar al máximo el software y las configuraciones del detector. Por ejemplo, el aumento de la frecuencia de detección hace que el análisis de



compuestos con picos delgados no sea posible. Este es el caso para equipos análogos, pues las especificaciones de equipos más modernos automatizados permiten manejar de manera eficaz los datos obtenidos. El siguiente paso consiste en la modificación de parámetros cromatográficos que principalmente provoca cambios en las interacciones entre la muestra y la fase estacionaria. Con una fuerza de interacción constante, los métodos cromatográficos pueden seguir siendo optimizados para conseguir una mayor eficiencia, que a su vez permitirá mejorar la resolución de los compuestos separados. La eficiencia cromatográfica es afectada por un gran número de variables experimentales que incluyen la presión, la temperatura, el tamaño de partícula, la longitud de columna y la velocidad y composición de fase móvil. A veces la baja disponibilidad de varios tipos de columna limita la optimización por lo que se suele optar por ajustar las variables operacionales como la temperatura de columna y la velocidad de flujo (Kromidas, 2006; Wang, Carr, & Stoll, 2010).

1.7.2. Eficiencia y resolución cromatográfica

La eficiencia es una medida de engrosamiento de la banda cromatográfica y equivale a una magnitud adimensional llamada número de platos teóricos, un concepto matemático que explica la separación del analito en la columna. El cálculo de platos teóricos (N) se hace mediante la prolongación de las tangentes a las curvas descendentes del pico gaussiano hasta llegar a cortar el eje de las x en dos puntos (Dong, 2006). A mayor N, mayor la eficiencia; es decir se presentarán picos más delgados y acusados.

La resolución (Rs) es una medida del grado de separación de dos analitos adyacentes y está definida por el tiempo de retención entre los dos picos divididos para su ancho. Cuando la resolución es cero se entiende una completa coelución o no separación de los analitos. Una resolución igual a la unidad indica la separación parcial y es el mínimo requerimiento para la cuantificación. La resolución depende de varios factores termodinámicos tales como retención, selectividad y eficiencia. Estos factores a su vez están controlados por la composición de la fase móvil, composición de la fase



estacionaria, la temperatura, el flujo, la longitud de la columna y el tamaño de partícula (Dong, 2006).

La modificación de los parámetros operacionales altera el modo de interacción del analito con la columna en el sistema cromatográfico, variando la eficiencia y consecuentemente la resolución. Por ejemplo, la temperatura elevada puede reducir la retención del soluto o la viscosidad de la fase móvil, por lo tanto, incrementando la eficiencia de la columna (Afsah-Hejri, Jinap, & Mirhosseini, 2012). Por otro lado, al aumentar la velocidad de flujo se obtienen con picos más delgados con una disminución en el tiempo de retención, pero si sobrepasa lo ideal también una disminución en el número de platos teóricos (Snyder et al., 1997).

1.8. Extracción de polifenoles

El objetivo final de la extracción es la preparación de un extracto homogéneo que contenga los componentes de interés y la cantidad de moléculas que son consideradas como interferencias (Evans et al., 2009). En particular, el aislamiento de compuestos fenólicos de la matriz de una muestra es generalmente un prerrequisito primordial en cualquier esquema de análisis (Antolovich, Prenzler, Robards, & Ryan, 2000; García & Cárdenas, 2016).

Desarrollar un método único para la extracción óptima de todos los polifenoles es complejo debido a la diversidad estructural y su efecto en el comportamiento fisicoquímico de estos compuestos. Especialmente, la polaridad de los polifenoles puede variar significativamente debido a la presencia de múltiples grupos hidroxilos y por su potencial conjugación con azúcares, ácidos, o grupos alquilos (Antolovich et al., 2000; Garcia-Salas, Morales-Soto, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2010). Se debe considerar también que algunos compuestos fenólicos son fácilmente hidrolizables y muchos son relativamente oxidables, lo que complica aún más el manejo de las muestras (Antolovich et al., 2000; García & Cárdenas, 2016). Además, la labor de recuperación del analito de la fruta es complicada pues la matriz natural posee una alta actividad enzimática que modifica constantemente a sus componentes (Tsao, 2010; Vermerris & Nicholson, 2006). Por consiguiente, la extracción debe ser



realizarse con el solvente más adecuado bajo condiciones predeterminadas de temperatura y pH, cuidadosamente evitando la modificación química como la oxidación, degradación térmica, y otros cambios químicos y bioquímicos en la muestra. Con este fin, incluso existen procedimientos protectores tales como la adición de antioxidantes durante la extracción y el uso de atmósferas inertes (de Rijke et al., 2006).

1.8.1. Métodos de extracción de polifenoles

La preparación de la muestra varía según el tipo de compuesto fenólico a extraer y puede ir desde la extracción exhaustiva con solvente y pre-concentración con equipos especializados hasta la simple extracción líquida-líquida y filtración (Garcia-Salas et al., 2010).

En el caso de las frutas y vegetales, el procedimiento de extracción es secuencial y se lleva a cabo usando generalmente un solvente orgánico acuoso. Este método tradicional se lo denomina extracción líquido-líquido (ELL). En la actualidad, otras metodologías han sido desarrolladas para reducir el consumo de solventes y acelerar los procesos de extracción. Estas técnicas modernas incluyen la extracción de fase sólida (EFS o SPE por sus siglas en inglés), extracción con fluido supercrítico (EFSC o SFE por sus siglas en inglés), extracción líquida presurizada (ELP) y la extracción asistida por microondas (EAM) (Garcia-Salas et al., 2010).

Para la ELL se recomienda un sistema que use la mezcla de varios solventes pues los compuestos fenólicos tienen alta variabilidad en cuanto a su estructura, y consecuente polaridad. Diferentes solventes se mencionan en la literatura como metanol, etanol, acetona y sus combinaciones, así como también mezclas acuosas-alcohólicas o solamente agua. El uso de este último se recomienda cuando las matrices son líquidas y se encuentran asociadas a algún tipo de alcohol, básicamente en bebidas alcohólicas. Entre los problemas de trabajo con extractos acuosos, se menciona la dificultad de evaporación del solvente y reacciones de degradación como hidrólisis. Durante la ELL, la actividad enzimática puede degradar a los polifenoles por lo que se recomienda trabajar con muestras liofilizadas. La principal desventaja de la ELL es que



requiere solventes orgánicos que son indeseables por razones de bioseguridad o porque el proceso de extracción podría requerir mucho tiempo lo que da paso a posibles degradaciones. El tiempo de extracción depende de varios factores como el tiempo de maceración, centrifugación y evaporación de solventes (del Cornò et al., 2016; Garcia-Salas et al., 2010; Motilva, Serra, & Macià, 2013).

La EFS requiere el uso un material de empaque cromatográfico contenido en un cartucho que químicamente separa los diferentes componentes de una muestra. Generalmente, se usan para la separación de polifenoles materiales de fase reversa como sílica gel modificada con radicales alquilos o arilos hidrofóbicos (basados en C18) o adsorbentes poliméricos. La EFS es una técnica más eficiente que la ELL y puede ser automatizada, evitando así los problemas con la ELL. No obstante, el costo del equipo requerido para la EFS es más alto (Garcia-Salas et al., 2010; Motilva et al., 2013).

Por otro lado, la EFSC la ELP y la EAM tienen cortos tiempos de extracción y usa poca cantidad de solventes, pero requieren equipos especializados y costosos (Garcia-Salas et al., 2010). En particular, la EFSC tiene las ventajas de trabajar a bajas temperaturas, sin requerir solventes y con un consumo reducido de energía. Sin embargo, su principal desventaja es estar limitada para compuestos con baja o mediana polaridad (Garcia-Salas et al., 2010).

1.9. Diseños experimentales y optimización

En general, las dos aplicaciones principales de los diseños experimentales son el cribado o screening (en el que los factores que influyen en el experimento son identificados) y la optimización (en el que las condiciones óptimas para un experimento son encontradas). El enfoque usual es aplicar estos dos diseños secuencialmente. Posteriormente, los resultados de los diseños generados suelen ser evaluados por el análisis de varianza (ANOVA). En estudios de screening, usar modelos de interacción lineal, como el diseño factorial completo, es muy común; mientras que para optimizar se prefiere utilizar metodología de superficie de respuesta (Ferreira et al., 2007).



1.9.1. Diseño factorial

Los diseños factoriales permiten al experimentador seleccionar qué factores son significativos y en qué niveles. Factor es la variable independiente estudiada. Los niveles se refieren a los valores límites establecidas para dichas variables. El diseño factorial completo es considerado el más general y se investiga las influencias lineales de todas las variables experimentales, factores, y efectos de interacción sobre la respuesta. Si la combinación de k factores son investigados en dos niveles, el diseño consistirá en 2^k experimentos. Los niveles de los factores se representan con un signo (-) para el nivel bajo y un signo menos (+) para el nivel mayor, o con la connotación -1 y 1, respectivamente (Ferreira et al., 2007).

En el planteamiento de este diseño se suele incluir un nivel cero (0) o punto central siendo éste un valor promedio entre el nivel negativo y positivo (Hanrahan & Lu, 2006). Es recomendado el uso de tres o cuatro experimentos centrales para minimizar el riesgo de pasar por alto relaciones no lineales en medio de los intervalos. También se aconseja incluir repeticiones para permitir la determinación de intervalo de confianza. Si el valor para la respuesta del punto central es muy diferente del valor de la media (b_0), será necesario incluir términos cuadráticos al modelo y experimentos adicionales tendrán que llevarse a cabo (Lundstedt et al., 1998).

El modelo polinomial más simple contiene solo los términos lineales y describe la relación entre las variables y la respuesta. Este modelo corresponde a la siguiente ecuación (Lundstedt et al., 1998):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \varepsilon$$

Donde y es el valor de respuesta que se espera; b_0 es el intercepto, b_1 , b_2 , son los coeficientes de regresión del modelo; x_1 , y x_2 son los códigos de los factores estudiados y ε es el error.

El modelo de segundo orden contiene términos adicionales que miden la interacción entre las diferentes variables. El modelo del diseño factorial de segundo orden para 3 variables corresponde a la siguiente ecuación (Lundstedt et al., 1998):



$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + \varepsilon$$

Donde b_{12} , b_{13} , b_{23} y b_{123} son los coeficientes de regresión de interacción del modelo.

1.9.2. Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) explora la relación entre varias variables explicativas y una o más variables de respuestas y determina las condiciones para una respuesta óptima. Es una técnica multivariadas que matemáticamente ajusta el dominio experimental estudiado en el diseño teórico a través de una función de respuesta (Hanrahan & Lu, 2006).

Entre los diseños de RSM, está el diseño central compuesto (CCD, por sus siglas en inglés) en el que se construye un modelo de segundo orden (cuadrático) que contiene un diseño factorial completo y experimentos de punto central. El CCD además se construye con puntos axiales (α y $-\alpha$) que permiten la estimación de la curvatura y representan los nuevos valores extremos de cada factor en el diseño (Ferreira et al., 2007; Hanrahan & Lu, 2006). El modelo CCD corresponde a la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Donde y es el valor de respuesta que se espera; β_0 es el término constante, β_i es el coeficiente de los parámetros lineales, β_{ij} es el coeficiente de interacción de los parámetros; X_i y X_j son los códigos de los factores estudiados; k es el número de factores analizados; y ε es el error experimental frente al calculado.



2. METODOLOGÍA

2.1. Diseño y tipo de investigación

El estudio fue de tipo experimental, analítico, cuantitativo cuyo objetivo fue la optimización del método cromatográfico para el análisis de polifenoles en frutas.

2.2. Muestreo

Para la obtención de extractos se utilizaron muestras de mango liofilizado almacenadas a -20°C en fundas metálicas herméticamente selladas. Las muestras fueron provistas por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, pertenecientes al ensayo interlaboratorio del proyecto de investigación TEAM-VLIR “Improving Ecuadorian child nutrition by using mango by-products as potential sources of bioactive compounds” (Grant N° TEAM2017PR442 – 75644).

2.3. Análisis de muestras

2.3.1. Equipos, reactivos y materiales

Los materiales, reactivos, estándares y los equipos utilizados fueron provistos por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, como parte del mencionado proyecto de investigación TEAM-VLIR.

Los estándares utilizados fueron ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido gálico, epicatequina, apigenina, mangiferina, rutina, luteolina, quercetina. Los solventes metanol y acetonitrilo fueron de grado HPLC, mientras que el ácido acético glacial fue de grado analítico. Los estándares, solventes y ácido acético fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemania). El agua ultrapurificada se obtuvo mediante el purificador de agua marca Barnstead International (modelo D11931, USA). Las preparaciones acuosas de las fases móviles se filtraron usando un sistema soporte de vidrio para filtración (Glassco, modelo 47 mm,



India) usando filtros de membrana de nylon de 47 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro (Aura, USA)

Se utilizó el cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC modelo Agilent 1200 series (Agilent, USA), provisto de una bomba cuaternaria, automuestreador con termostato y acoplado a un detector DAD. La separación se realizó mediante una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm) (Agilent, USA).

Para la extracción se usó el baño ultrasónico digital (Branson, modelo 3510R-DTH, USA), mezclador vórtex (Velp Scientifica, modelo Classic, Italia), centrífuga (Hettich, modelo EBA20, Alemania), generador de nitrógeno (Domnick Hunter, modelo G4510W, USA), jeringas plásticas estériles desechables de 3 mL (Nipro, USA), filtros de jeringa de PVDF 0.45 μm de tamaño de poro (Whatman™, USA)

2.4. Métodos analíticos

2.4.1. Preparación de estándares

Soluciones stock individuales de los estándares de ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido gálico, epicatequina, apigenina, mangiferina, rutina, luteolina, quercetina fueron preparados a una concentración de 1 mg/mL en metanol puro grado HPLC. Las soluciones fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización. Las diluciones siguientes, individuales y en mezcla, también se prepararon con metanol puro.

2.4.2. Condiciones cromatográficas para las corridas iniciales

Se realizó una revisión bibliográfica para determinar los parámetros instrumentales más comúnmente utilizados en el análisis de polifenoles. Estos parámetros incluyeron la composición fase móvil, temperatura, fase móvil, flujo, volumen de inyección, y longitudes de onda para el detector DAD. Luego de 10 ensayos preliminares, los parámetros fueron modificados para obtener un método adecuado en términos de resolución y eficiencia aceptable como punto

de partida. En base a esta propuesta inicial del método se procedió a diseñar el experimento factorial.

La propuesta inicial del método tuvo una duración de 37 min bajo las siguientes condiciones:

- Volumen de inyección 10 μ L
- Temperatura de la columna: 30°C
- Flujo de la fase móvil: 1 mL/min
- Longitudes de onda de detector DAD: 245, 280 y 320 nm
- Fase móvil A: agua/ácido acético 0.3% v/v
- Fase móvil B: acetonitrilo/agua 50:50 v/v + ácido acético 0.3%
- Gradiente: Inicio de 10% B hasta 2 min, seguido de un incremento a 55% B hasta los 27 min, luego un incremento hasta 100% B a los 32 min manteniéndolo hasta los 35 min, para finalmente regresar a las condiciones iniciales en 0.5 min mantenidos por 0.5 min adicionales para equilibración (Figura 8).

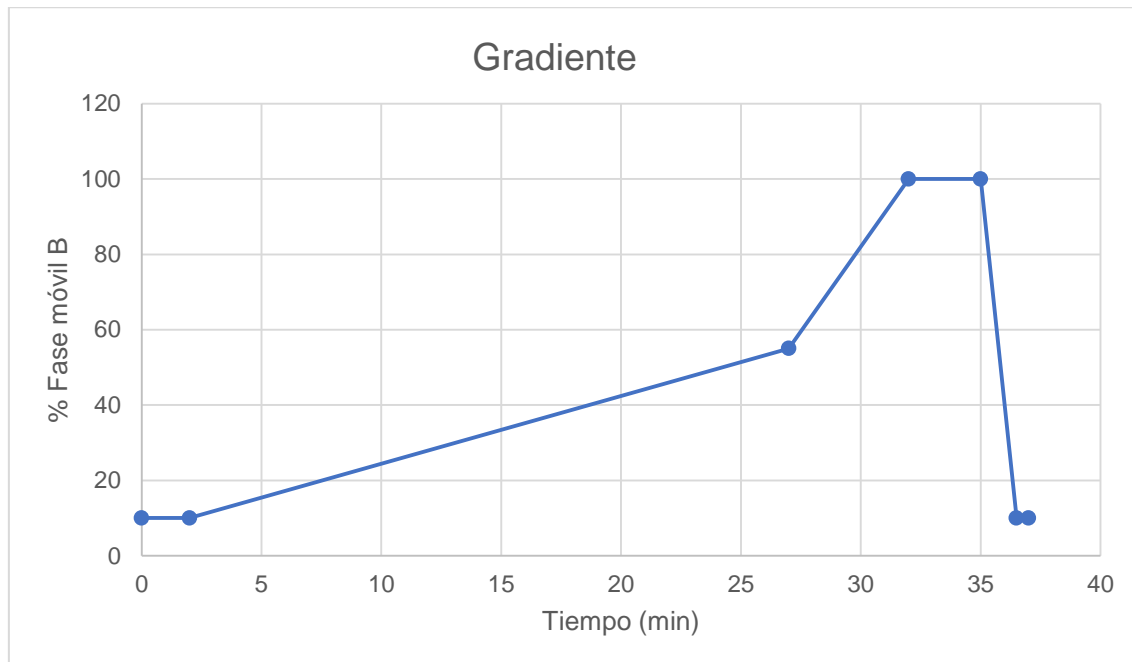


Figura 8. Gradiente de fase móvil en relación con el tiempo para corridas iniciales.

2.4.3. Optimización experimental factorial

La primera etapa de la optimización se basó en un diseño factorial completo para investigar las influencias lineales de las variables independientes flujo, acidificación de la fase móvil y temperatura de la columna, y efectos de interacción de éstas sobre la eficiencia. Corresponde a un diseño 2^3 . Cada variable independiente fue evaluada a 2 niveles (-1 y 1), incluyendo mediciones de punto central (0) (Tabla 2). En total, se realizaron 20 experimentos conformados por 8 experimentos factoriales por duplicado y 4 experimentos del punto central (Tabla 3).

Tabla 2. Denotación y niveles de las variables dependientes del diseño factorial.

Variable	-1	0	1
X1: Velocidad de flujo (mL/min)	0.8	1	1.2
X2: Porcentaje de ácido en fase móvil A (%)	0.1	0.3	0.5
X3: Temperatura de la columna (°C)	20	30	40

Tabla 3. Diseño matemático factorial 2^3 . X1: velocidad de flujo, X2: porcentaje de ácido en fase móvil A, X3: temperatura de la columna.

Orden aleatorizado de corridas analíticas	Experimento	X1	X2	X3
9	1	-1	-1	-1
18	2	1	-1	-1
7	3	-1	1	-1
16	4	1	1	-1
5	5	-1	-1	1
14	6	1	-1	1
3	7	-1	1	1
12	8	1	1	1
1	1	-1	-1	-1
10	2	1	-1	-1
19	3	-1	1	-1
8	4	1	1	-1
17	5	-1	-1	1
6	6	1	-1	1
15	7	-1	1	1
4	8	1	1	1
13	9	0	0	0
2	9	0	0	0
11	9	0	0	0
20	9	0	0	0



La variable respuesta o dependiente del diseño factorial fue la eficiencia de los picos cromatográficos de los estándares de polifenoles. A partir de los datos obtenidos en las corridas analíticas se calculó la eficiencia para cada experimento con la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Donde, N es el número de platos teóricos o eficiencia, t_R es el tiempo de retención del pico y W_b es el ancho del pico en la base (Dong, 2006).

Los efectos de las variables independientes sobre la variable respuesta se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA). A partir de los efectos se calcularon los efectos estandarizados que fueron los valores utilizados para evaluar la significancia estadística de las variables experimentadas. El efecto estandarizado se calculó dividiendo el efecto de cada variable (estimado obtenido por ANOVA) para el error estándar del efecto. Además, se realizaron diagramas de Pareto estandarizado y test de mejor ANOVA. Finalmente, se llevó a cabo un test de falta de ajuste para evaluar la necesidad de proseguir a un modelo cuadrático que permita determinar las condiciones experimentales óptimas.

2.4.4. Optimización experimental: diseño central compuesto

Para la segunda etapa de la optimización, se utilizó un modelo experimental de diseño central compuesto de 2 variables en 5 niveles (Tabla 4). Este diseño se aplicó para determinar la respuesta cuadrática de las variables propuestas inicialmente en el diseño factorial que mostraron significancia estadística, pero a la vez demostraron una falta de ajuste en el modelo factorial. Las variables dependientes incluidas en este modelo fueron la velocidad de flujo y la temperatura de la columna (Tabla 5). La variable de acidificación de la fase móvil se excluyó del CCD por su falta de significancia estadística en todos los experimentos del diseño factorial.

En el CCD planteado también se incluyeron puntos axiales (α y $-\alpha$) para estimar la curvatura. Los valores de α son dependientes del número de variables, y



para 2 variables $\alpha = 1.414$. Finalmente, se realizó el escalamiento de los valores de los puntos axiales a las unidades de las variables.

Tabla 4. Denotación y niveles de las variables dependientes del CCD.

Variable	$-\alpha$	-1	0	1	α
X1: Velocidad de flujo (mL/min)	0.66	0.8	1	1.2	1.34
X2: Temperatura de la columna (°C)	19.8	24	30	36	40.2

Tabla 5. Diseño matemático del CCD. X1: velocidad de flujo, X2: temperatura de la columna.

Orden aleatorizado de corridas	Experimento	X1	X2	Parte
4	1	-1	-1	Diseño factorial
11	2	1	-1	
12	3	-1	1	
6	4	1	1	
1	5	0	0	Punto central
10	6	0	0	
2	7	0	0	
9	8	0	0	Puntos axiales
7	9	$-\alpha$	0	
8	10	α	0	
3	11	0	$-\alpha$	
5	12	0	α	

La variable respuesta del CCD fue la eficiencia de los picos cromatográficos de los estándares de polifenoles para cada experimento. Los efectos de las variables independientes sobre la eficiencia y sus interacciones se determinaron mediante la estimación de coeficiente de determinación y valores P, lo que permitió medir su significancia estadística tanto a nivel lineal como a

nivel cuadrático. Además, se obtuvieron los puntos estacionarios sugeridos de tanto la temperatura y el flujo.

2.4.5. Optimización multirespuesta: pruebas de deseabilidad

Con el fin de obtener las mejores condiciones individuales y grupales de las variables para obtener una eficiencia óptima, se realizó un test de deseabilidad individual y compuesta de cada uno de los compuestos estudiados en relación con la eficiencia mínima y máxima obtenida (límites S). El test de deseabilidad proporciona las condiciones óptimas de manera codificada. Se usó una función de deseabilidad de rango de 1 a 5 (punto R) para ponderar cada uno de los estándares en función de importancia de obtención del compuesto. Para esto se estableció una rúbrica de puntuación para cada compuesto que considera: i) la dificultad de obtener el compuesto en el cromatograma (picos muy pequeños, límites de detección aparentemente bajos, posibles problemas de coelución) y ii) la expectativa de los compuestos en la matriz a analizar (Tabla 6). La suma de las puntuaciones individuales (puntuación total) será el valor del punto R.

Tabla 6. Criterios para determinar puntuación para punto R.

Puntuación	Descripción
	Dificultad
0	No dificultoso
1	Algo dificultoso
2	Muy dificultoso
	Expectativa
0	No se espera nada de contenido
1	Se espera algo de contenido
2	Se espera mucho contenido

Luego del test de deseabilidad se realizaron corridas analíticas adicionales con los resultados de las condiciones propuestas por dicho test para determinar si se obtenían mayores eficiencias a nivel práctico y para determinar cualquier



inconveniente analítico (picos dobles, respuestas instrumentales muy bajas, coelución de estándares). Estas corridas analíticas se realizaron con una solución con la mezcla de todos los estándares a 1 µg/L.

2.5. Extracción de polifenoles

La metodología de extracción de polifenoles de matrices de frutas no se optimizó de manera experimental, sino que se basó en una revisión de diversos artículos científicos siguiendo el proceso que se detalla a continuación.

2.5.1. Selección de los estudios

La revisión de literatura se realizó usando varias fuentes de búsquedas para la localización e identificación de los estudios. Se incluyeron las siguientes bases de datos electrónicas: Science Direct, EBSCO Host, Scopus, ProQuest, Medline, Google Scholar, Springer, Scielo y Taylor & Francis.

En base a los títulos y resúmenes de cada uno de los estudios, se hizo una primera selección de los potenciales artículos elegibles (n=51 artículos) en base a los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

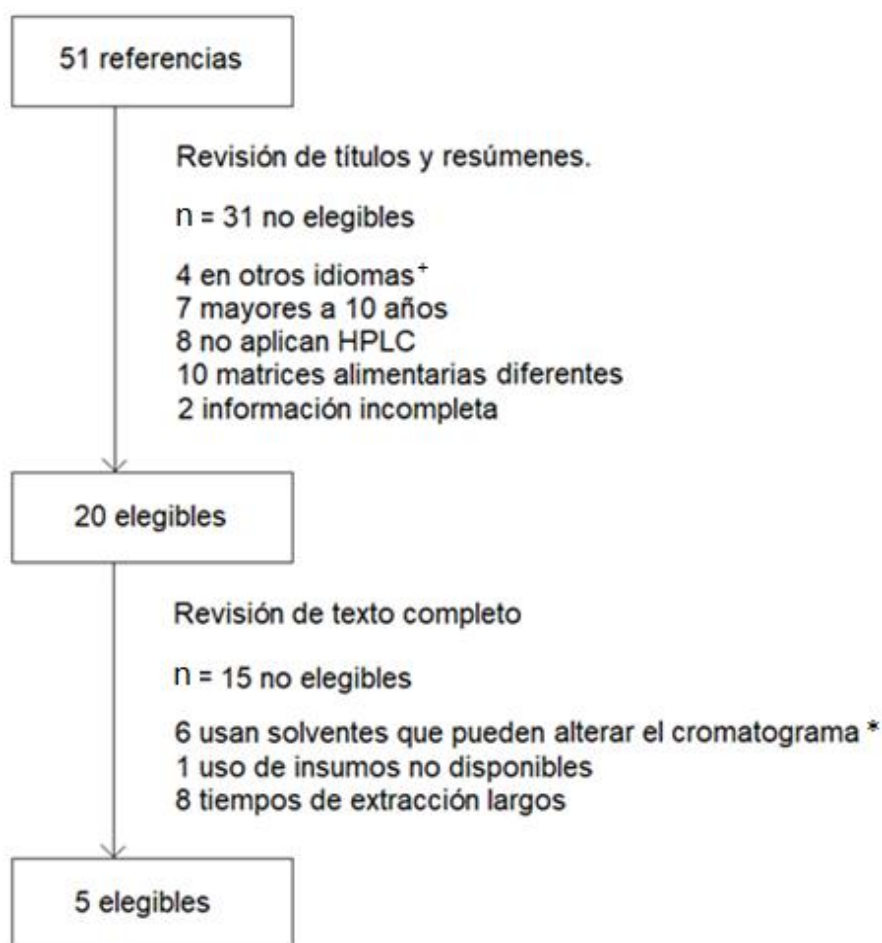
- Estudios que apliquen posteriormente una metodología de cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos para cuantificación de polifenoles
- Estudios que refieran a matrices vegetales o de frutas
- Artículos publicados en los últimos 10 años
- Estudios en el idioma inglés y español

Criterios de exclusión:

- Estudios exclusivos de antocianidinas u otros polifenoles que no sean de los grupos de los estándares disponibles.

Luego se procedió a una lectura de texto completo para, en base a las consideraciones más estrictas, seleccionar los artículos que finalmente serían

excluidos. Estas consideraciones fueron la disponibilidad de insumos, solventes, tiempos de extracción y naturaleza del analito a extraer (polaridad, sensibilidad a solventes, estabilidad térmica) (Figura 9).



⁺En idiomas diferentes al español o inglés

*Solventes que produce división de los picos cromatográficos

Figura 9. Esquema de la revisión bibliográfica para la extracción de los polifenoles en frutas.

2.6. Aplicación del método analítico optimizado

Se aplicó el método optimizado en el extracto obtenido para detectar y cuantificar los polifenoles. Se realizaron curvas de calibración de los estándares con 5 puntos equidistantes en un rango amplio de 50 a 1000 µg/L con el fin de determinar los límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y el rango dinámico lineal.



Los límites de detección (LOD) se calcularon usando la fórmula:

$$LOD = 3 \times s_{eb}/m.$$

Donde s_{eb} es el error estándar del intercepto y m es la pendiente de la curva de calibración. Los límites de cuantificación (LOQ) se calcularon como $LOD \times 2$ (Ravisankar, Pravallika, & Navya Sri, 2015).

El método de extracción de polifenoles seleccionado se aplicó en mango liofilizado tomado como matriz de prueba. La extracción se realizó por triplicado y el extracto seco final se reconstituyó en metanol para su análisis con el método optimizado por HPLC-DAD. Se identificaron los analitos en base a los tiempos de retención de los estándares y la cuantificación se realizó por interpolación de las curvas de calibración de los polifenoles, de acuerdo con la ecuación de estandarización externa:

$$Y = mX + b$$

Dónde Y corresponde al área del pico cromatográfico, X corresponde a la concentración del compuesto, m corresponde a la pendiente y b corresponde al intercepto de la ecuación de la recta.

2.7. Análisis estadístico

Los cálculos y análisis estadístico para el diseño factorial (ANOVA, diagramas de Pareto estandarizado, mejor ANOVA, test de falta de ajuste), cálculos de la eficiencia, y cuantificación (límite de detección y de cuantificación) se realizaron en Microsoft Excel 8.0 Para el diseño central compuesto y pruebas de deseabilidad, los cálculos y análisis estadísticos se realizaron en el software estadístico R. Para la recolección de datos de los cromatogramas (tiempo de retención, ancho de pico, área, gráficos de cromatograma) se empleó el software

Agilent

ChemStation.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Pruebas preliminares

Con las condiciones iniciales de análisis se llevaron a cabo corridas iniciales con soluciones de estándares en mezcla e individuales con el fin de determinar los tiempos de retención y longitudes de onda óptimas para cada compuesto. Estas condiciones fueron: volumen de inyección 10 μ L, temperatura de la columna de 30°C, flujo de la fase móvil 1 mL/min, longitudes de onda de detector DAD 245, 280 y 320 nm, agua/ácido acético 0.3% v/v como fase móvil A, acetonitrilo/agua 50:50v/v + ácido acético 0.3% fase móvil B, gradiente de 37 min. Las longitudes de onda consideradas como óptimas para cada compuesto fueron aquellas que proporcionaron el área de mayor valor para cada pico cromatográfico, siendo 254 nm para mangiferina, rutina, luteolina y quercetina, 280 nm para ácido gálico y epicatequina, y 320 nm para ácido clorogénico, ácido ferúlico y apigenina.

Los tiempos de retención y las longitudes de onda preferencial (mayor área y menor ruido de fondo) y alternativa (señal con menor área que la preferencial) de cada uno de los compuestos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Tiempos de retención y longitudes de onda de los estándares de polifenoles en las corridas iniciales.

Estándar	t_R (min)	λ Preferencial (nm)	λ Alternativa (nm)
Mangiferina	17.33	254	320
Rutina	22.94	254	-
Luteolina	33.13	254	320
Quercetina	33.27	254	-
Ácido gálico	5.57	280	254
Epicatequina	18.13	280	-
Ácido clorogénico	14.25	320	-
Ácido ferúlico	22.19	320	280



Apigenina	34.80	320	-
-----------	-------	-----	---

La cromatografía líquida de alta resolución está sujeta a varias fuentes de error como la incompatibilidad del solvente de inyección y la fase móvil, resultando en picos divididos o distorsionados debido a interacciones químicas que desestabilizan los compuestos (Kimura & Rodriguez-Amaya, 1999). Esto fue lo observado en las corridas iniciales de los estándares al usar acetonitrilo como solvente de reconstitución e inyección. Luego, al cambiar el solvente por metanol se pudo resolver este inconveniente. De igual manera, se observó menos ruido en la línea base del cromatograma cuando se usó metanol como fase móvil. Por lo que se optó trabajar con metanol como solvente de dilución de los estándares y fase móvil.

Además, se observó que los picos de luteolina y quercetina tenían tiempos de retención muy próximos, sin llegar a coeluir. La diferenciación de estos picos fue posible por las diferencias presentadas en el espectro UV, pues la quercetina presenta una respuesta instrumental inversa a 320nm.

3.2. Diseño factorial

En la fase factorial del estudio se obtuvieron los valores de eficiencias para cada uno de los compuestos por experimento y sus réplicas (Tabla 8). Se escogieron los datos a las mejores longitudes de onda para los cálculos. Del análisis se excluyeron los cálculos para la luteolina y quercetina porque se presentaron coeluidos bajo las distintas condiciones experimentales.



Tabla 8. Eficiencia cromatográfica para los estándares bajo las condiciones del diseño factorial. E: experimento, R: repetición. ^a longitud de onda 254 nm, ^b longitud de onda 280 nm, ^c longitud de onda 320 nm.

Estándar	Mangiferina ^a	Rutina ^a	Luteolina ^a	Quercetina ^a	Ácido gálico ^b	Epicatequina ^b	Ácido clorogénico ^c	Ácido ferúlico ^c	Apigenina ^c
E1 R1	445402.6	1051385.0	3000918.3	3403144.9	41088.4	594682.2	38793.9	582758.7	2953704.1
E1 R2	306188.1	413635.1	3153682.2	2019870.6	5709.5	91830.8	31838.2	603632.0	2989857.5
E2 R1	406011.6	754156.1	3549922.9	3742242.7	23564.9	484756.5	52952.6	611073.7	4350478.8
E2 R2	344868.2	456162.2	3562053.6	3669063.3	89995.0	502701.3	40711.8	500461.6	4141904.4
E3 R1	359594.9	881713.2	3336559.0	2759649.2	32106.6	572572.6	55347.4	590930.2	2830136.5
E3 R2	343016.4	1098995.9	3925466.1	2903487.8	37070.9	537407.5	71725.5	556579.5	3553034.7
E4 R1	346981.6	919407.0	3956431.5	3890499.6	24514.2	501796.2	70140.4	535179.5	3735789.5
E4 R2	314445.8	794239.5	3203378.5	3171553.1	24976.1	637010.8	66918.9	488787.0	3890119.2
E5 R1	252473.6	993839.9	*	*	27742.1	301558.3	42333.0	456952.6	3385811.0
E5 R2	307926.5	850849.4	*	*	40648.9	276372.9	153023.0	449880.5	3217121.9
E6 R1	201131.4	877164.0	*	*	19761.9	349404.7	53511.2	487699.5	3643755.5
E6 R2	220729.7	1267079.7	*	*	21874.1	529294.1	36484.2	412474.5	3726672.5
E7 R1	271805.9	843466.0	2810981.2	2875835.1	20776.6	342077.8	65314.8	452272.3	3985134.4
E7 R2	259228.5	1060148.2	2574102.7	2674106.8	41326.6	175659.3	69429.3	451322.1	2020066.2
E8 R1	182644.6	1025693.5	*	*	20134.5	150017.7	46147.1	467568.1	4403808.1
E8 R2	214728.0	382769.2	*	*	4099.7	391321.2	40702.3	431101.6	3868445.8
E9 R1	276181.5	1143170.4	2856050.8	2018316.0	30415.5	353980.5	38440.5	441940.6	4170473.7
E9 R2	173462.4	1070844.7	2765846.7	2914880.7	18995.6	196221.3	35430.6	457067.2	3949486.8
E9 R3	291902.1	1165348.6	2696675.9	1953223.1	26235.0	352469.0	35102.2	481984.5	3737487.8
E9 R4	292558.8	1009933.2	2433400.2	2118328.9	33836.5	513455.8	57500.8	495501.0	3832584.8



Las variables que tuvieron un efecto estandarizado mayor al valor crítico $t = 2.18$ en el análisis ANOVA fueron consideradas significativas. Para la mangiferina, epicatequina, y ácido ferúlico, la variable temperatura de columna fue significativa en términos de eficiencia cromatográfica. Para la apigenina, sólo la variable velocidad de flujo fue significativa. Por otro lado, la variable del grado de acidificación de la fase móvil no fue significativa en ningún caso. Esto se esquematiza en los diagramas de Pareto correspondientes donde si los valores estandarizados superan el valor crítico t confirma el efecto de la variable experimental sobre la variable respuesta (eficiencia cromatográfica) (Figura 10). Sin embargo, los R^2 ajustados mostraron valores de -0.09 a 0.61 , indicativo de un bajo ajuste que podría atribuirse a que el cromatógrafo en el diseño factorial tenía que hacer arreglos muy bruscos de las condiciones instrumentales entre experimentos, cambiando rangos de temperatura de hasta 20°C , velocidades de flujo en rangos de hasta 0.4 mL/min , y fases móviles con distinta concentración de ácido en un rango de hasta 0.4% .

El test de mejor ANOVA suma los errores de los componentes no significativos del modelo y lo agrega al error total para que la prueba sea más estricta. Esto se hace para comprobar si, luego de dicho ajuste, las variables establecidas como significativas en el ANOVA lo siguen siendo. En el diseño factorial aplicado, todas las variables significativas obtenidas por el ANOVA concordaron con el mejor ANOVA, exceptuando la apigenina para la que la variable velocidad de flujo fue no significativa.

La prueba de falta de ajuste contiene el peso ponderado de tanto las respuestas factoriales y centrales. Esta prueba considera si las variables analizadas de manera lineal pueden presentar además un efecto cuadrático en relación con la eficiencia, es decir que no varían de manera proporcional a ésta. En el diseño factorial aplicado, si los valores de F de cada variable superaban el valor crítico $F (4.45)$ se confirmaba el ajuste al modelo. Todas las variables presentaron una falta de ajuste ($F < 4.45$), lo que sugirió que las variables podrían ajustarse mejor a un modelo cuadrático y no lineal.

Cabe destacar que los experimentos 5, 6, y 8 no pudieron ser interpretados estadísticamente pues presentaron coelución de la luteolina y quercetina, que inicialmente se encontraban muy próximos. No se encontró razón aparente por

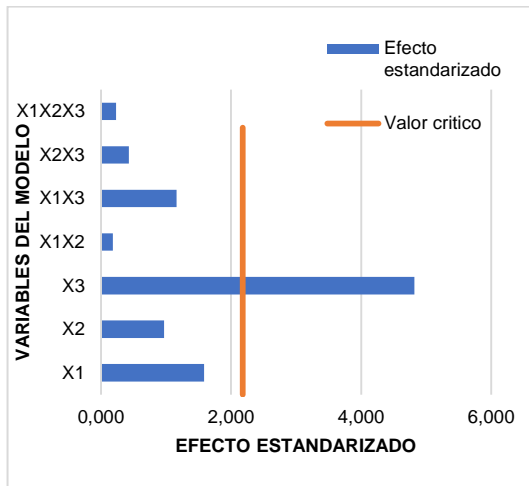
la cual dichos experimentos presentaron este fenómeno, pareciera que la interacción de las variables estudiadas a dichas condiciones propició que ambos compuestos se sobrepusieran. Para estos casos, según la literatura, se recomienda a más de los cambios de temperatura y flujo, la modificación de pH o de solventes orgánicos e incluso el cambio de columna (Dong, 2006).

En la Tabla 9 se muestran los valores de coeficiente de determinación (R^2) ajustado y los efectos estandarizados para el ANOVA, y los valores de R^2 ajustado y valores de los efectos para el mejor ANOVA. En el Anexo 1 se presentan los datos obtenidos y los cálculos usados en el análisis factorial.

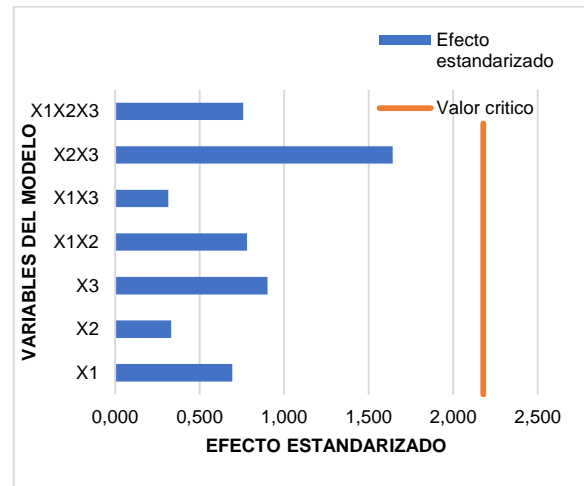
Tabla 9. Valores de R^2 ajustado y efectos según ANOVA y mejor ANOVA para las variables de experimentación del modelo factorial. X1: velocidad de flujo, X2: cantidad de ácido en fase móvil, X3: temperatura de la columna.

Estándar	Variable	ANOVA		Mejor ANOVA	
		R^2 ajustado	Efecto estandarizado	R^2 ajustado	Efecto
Mangiferina	X1	0.53	1.58	0.55	
	X2	0.53	0.97	0.55	
	X3	0.53	4.82*	0.55	-119480.11
Rutina	X1	-0.09	0.69	-0.01	
	X2	-0.09	0.33	-0.01	
	X3	-0.09	0.90	-0.01	
Ácido gálico	X1	0.08	0.26	0.02	
	X2	0.08	0.97	0.02	
	X3	0.08	1.22	0.02	
Epicatequina	X1	0.17	1.12	0.21	
	X2	0.17	0.30	0.21	
	X3	0.17	2.42*	0.21	-175881.48
Ácido clorogénico	X1	0.08	1.18	-0.03	
	X2	0.08	0.35	-0.03	
	X3	0.08	0.77	-0.03	
Ácido ferúlico	X1	0.61	1.38	0.63	
	X2	0.61	0.86	0.63	
	X3*	0.61	5.65*	0.63	-107516.38
Apigenina	X1*	0.27	3.44*	-0.06	-24276.18
	X2	0.27	0.06	-0.06	
	X3	0.27	0.09	-0.06	

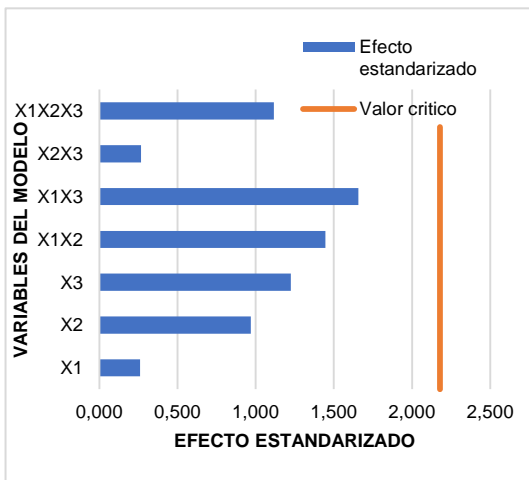
* Significativo



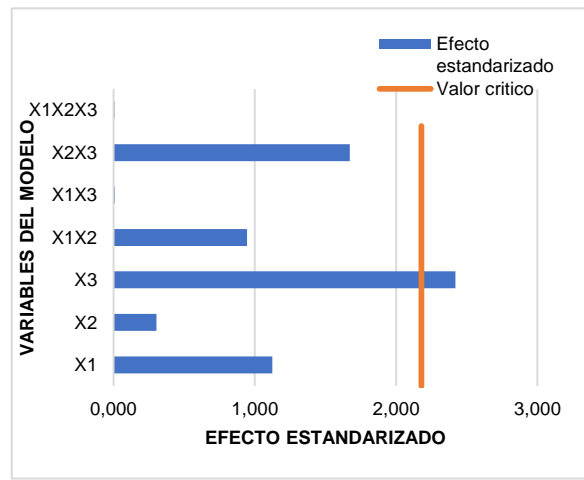
a) Mangiferina



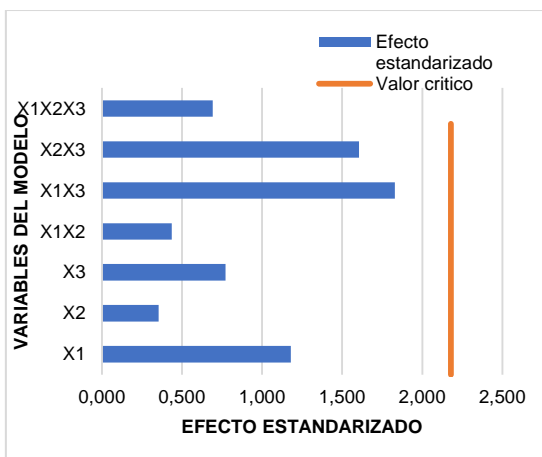
b) Rutina



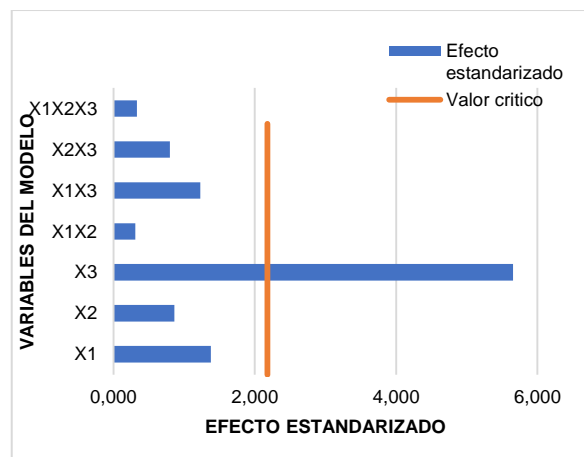
c) Ácido gálico



d) Epicatequina

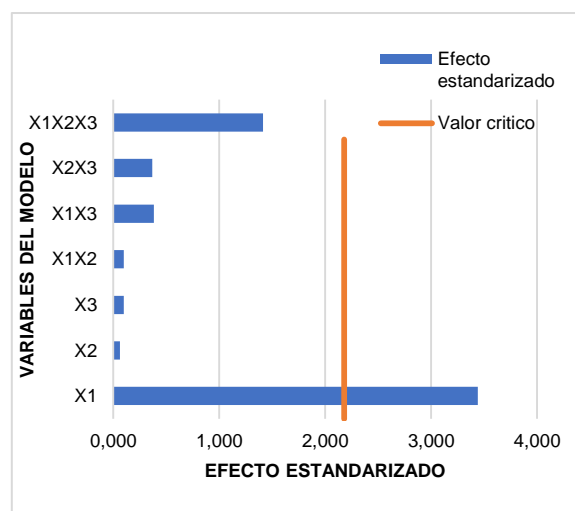


e) Ácido clorogénico



f) Ácido ferúlico

Figura 10. Diagrama de Pareto del diseño factorial para los estándares de polifenoles estudiados.



g) Apigenina

Figura 10. Continuación. Diagrama de Pareto del diseño factorial para los estándares de polifenoles estudiados.

3.3. Diseño central compuesto (CCD)

El diseño central compuesto (CCD) aplicado estuvo compuesto por dos partes, una factorial lineal y una cuadrática correspondiente a la metodología de superficie de respuesta (RSM por sus siglas en inglés). En el Anexo 2 se presentan en detalle los datos obtenidos y los cálculos usados empleados en el CCD.

A partir de este diseño se obtuvieron las eficiencias para cada uno de los compuestos por experimento (Tabla 10), así como también los valores de R^2 , R^2 ajustado de la parte factorial y de la parte cuadrática del experimento (Tabla 11). Cuando las interacciones fueron significativas, se consideraron las R^2 múltiples, caso contrario se evaluaron los resultados en función de los R^2 ajustados. La rutina y ácido gálico presentan R^2 mayores en el diseño lineal (0.88 y 0.91), mientras que la mangiferina, ácido clorogénico, ácido ferúlico y apigenina muestran mejor ajuste en el diseño cuadrático (R^2 de 0.85 a 0.95). La epicatequina presentó los menores valores de R^2 (< 0.68). En el caso de la rutina y ácido gálico, la interacción de las variables fue significativa; mientras que para la apigenina la variable cuadrática de temperatura fue significativa.

Tabla 10. Eficiencia de los estándares en el diseño central compuesto. E: experimento. ^a longitud de onda 254 nm, ^b longitud de onda 280 nm, ^c longitud de onda 320 nm.

Estándar	Mangiferina ^a	Rutina ^a	Ácido gálico ^b	Epicatequina ^b	Ácido clorogénico ^c	Ácido ferúlico ^c	Apigenina ^c
E1	409387.9	784754.5	40155.5	698269.8	187654.9	488783.8	11601502.9
E2	321655.7	520985.7	14104.1	210172.7	160938.3	457348.1	16821506.7
E3	367861.0	859536.6	22786.8	283098.0	199965.0	470561.1	7464342.8
E4	239161.5	1081620.0	22455.8	245526.3	102833.6	418333.9	16564219.5
E5	276755.3	837046.7	25727.0	154909.9	123865.4	465053.9	10496236.8
E6	303103.6	736767.7	21114.1	509296.9	143342.2	430195.4	9105755.4
E7	309719.4	914976.7	26868.4	248173.9	131883.4	455620.4	8270091.8
E8	335860.9	891260.1	20560.6	301763.4	160475.2	479926.6	10681082.3
E9	432406.0	746938.8	35099.7	374983.3	205766.5	505795.9	7939128.4
E10	213123.7	549888.0	11339.1	228823.2	109263.4	406380.2	18683157.3
E11	385503.5	835788.0	22633.8	361095.1	215195.4	463893.0	10878130.5
E12	294053.6	786827.2	31931.7	197797.6	79457.1	405404.8	11955268.5

Tabla 11. Valores de R^2 y valores P para el modelo CCD para la parte factorial lineal y la parte cuadrática (RSM). X1: velocidad de flujo, X2: temperatura de la columna, X1X2: interacción flujo-temperatura, $X1^2$: cuadrado de temperatura de columna, ND: no datos,

Estándar	Variable	FACTORIAL			RSM		
		R^2	R^2 ajustado	Valor P	R^2	R^2 ajustado	Valor P
Mangiferina	X1	0.82	0.69	0.020*	0.95	0.91	<0.001*
	X2	0.82	0.69	0.098	0.95	0.91	0.004*
Rutina	X1	0.88	0.79	0.788	0.60	0.27	0.388
	X2	0.88	0.79	0.011*	0.60	0.27	0.221
	X1:X2	0.88	0.79	0.028*	0.60	0.27	0.109
Ácido gálico	X1	0.91	0.85	0.011*	0.88	0.78	0.001*
	X2	0.91	0.85	0.197	0.88	0.78	0.595
	X1:X2	0.91	0.85	0.012*	0.88	0.78	0.016*
Epicatequina	X1	0.68	0.44	0.125	0.61	0.28	0.106
	X2	0.68	0.44	0.234	0.61	0.28	0.157
Ácido clorogénico	X1	0.76	0.57	0.044*	0.85	0.73	0.007*
	X2	0.76	0.57	0.342	0.85	0.73	0.009*
Ácido ferúlico	X1	0.67	0.42	0.082	0.85	0.73	0.003*
	X2	0.67	0.42	0.189	0.85	0.73	0.025*
Apigenina	X1	0.68	0.44	0.054	0.90	0.81	<0.001*
	X2	0.68	0.44	0.453	0.90	0.81	0.629
	$X1^2$	- **	- **	- **	0.90	0.81	0.025*

* Significativo

** En la parte factorial lineal no se analiza los cuadrados de las variables.

Como parte del CCD, fue posible obtener una propuesta de condiciones óptimas, conocidas como puntos estacionarios, para las variables analizadas de velocidad de flujo y temperatura de columna para cada uno de los compuestos (Tabla 12).

Tabla 12. Puntos estacionarios propuestos por el modelo mejor ajustado. X1p: punto estacionario propuesto para flujo (mL/min), X2p: punto estacionario propuesto para temperatura (°C).

Estándar	X1p	X2p
Mangiferina	2.60	56.55
Rutina	0.74	30.51
Ácido gálico	1.07	36.15
Epicatequina	1.17	37.00
Ácido clorogénico	0.28	1.99
Ácido ferúlico	2.68	5.06
Apigenina	0.68	37.28

Similar a lo observado en el diseño factorial, los experimentos 1, 9, y 11 presentaron coelución de la luteolina y quercetina por lo que no se pudo realizar la interpretación estadística de estos dos compuestos. Estos experimentos tenían en común una de sus variables en su nivel axial negativo - α , o la combinación de sus variables en su nivel -1 (ver Tabla 4 y 5). Esto corresponde a condiciones de temperatura y flujo muy bajas, que a su vez provoca una pérdida de resolución e incluso coelución de compuestos (Dong, 2006; Kromidas, 2006).

Por otro lado, se comprobó que la rutina y ácido gálico se ajustaron a un modelo lineal; mientras que el comportamiento de la mangiferina, ácido clorogénico, ácido ferúlico y apigenina se explicó con un modelo cuadrático. La velocidad de flujo fue una variable significativa para la mangiferina, ácido clorogénico, ácido ferúlico y apigenina; mientras que la temperatura fue significativa para la mangiferina, ácido clorogénico y gálico. Las interacciones de ambas variables fueron significativas para la rutina y ácido gálico. La única variable al cuadrado que presentó significancia fue la velocidad de flujo para la apigenina.

Los modelos del CCD presentaron R^2 más elevados (0.73 a 0.91), por lo que su ajuste fue más aceptable que el modelo obtenido en el diseño factorial. Sin embargo, la epicatequina no se ajustó al modelo, presentando valores de R^2 de



0.67 en el mejor de los casos. De manera similar, ninguna variable fue significativa para la epicatequina, sugiriendo que bajo las condiciones experimentales del modelo, la eficiencia de este compuesto es independiente de la modificación de estas variables fueron modificadas (Hanrahan & Lu, 2006).

Las condiciones propuestas de puntos estacionarios para la mangiferina, ácido clorogénico y ácido ferúlico no se consideraron factibles a nivel práctico. Los valores mínimos (0.28 mL/min y 1.99°C) provocarían una disminución sustancial de la resolución, así como picos distorsionados y otros inconvenientes. En contraste, los valores máximos (2.68 mL/min y 56.55 °C) afectarían potencialmente de manera adversa la columna analítica y alterarían estructuralmente los compuestos a analizar (Wang et al., 2010; Yahia, 2017).

3.4. Optimización multirespuesta: pruebas de deseabilidad

Los límites S (eficiencias mínimas y máximas) fueron seleccionados de los cromatogramas que no presentaban coelución. Se realizó la ponderación para obtener los puntos R en base a la experiencia que se tuvo en los ensayos preliminares y a revisión bibliográfica del contenido de polifenoles en la matriz. En el Anexo 3 se puede observar las eficiencias mínimas y máximas (límites S) utilizados y la ponderación de los compuestos para obtener los puntos R.

En el test de deseabilidad individual se obtuvo un valor de 0.5 (rango de 0 a 1) para cada uno de los compuestos (en el Anexo 4 se presenta los cálculos realizados), lo que significa que hubo un compromiso igualitario en el modelo para obtener las mejores condiciones globales o grupales para que cada estándar tenga una eficiencia adecuada (Becerra, Zitzumbo Guzmán, Domínguez Domínguez, García, & Alonso Romero, 2014).

En cuanto a la deseabilidad grupal, existen dos formas posibles de llevar a cabo este test; la primera de manera circular y la segunda de manera cuadrada. Se realizó el test de manera cuadrada para incluir más posibilidades de las variables. El valor obtenido de 0.7 representa teóricamente un ajuste mayor al individual sin llegar a ser lo suficientemente elevado para explicar por



completo el modelo aplicado, demostrando la extrema dificultad en desarrollar un método plenamente ajustado por las diferencias estructurales entre cada polifenol (Ran, Sun, Zhu, Chen, & Zhao, 2016).

La prueba de deseabilidad grupal lanza las condiciones de temperatura y flujo óptimas de análisis de manera codificada (adimensional). En la Tabla 13 se presentan los valores codificados y descodificados.

Tabla 13. Valores propuestos por test de deseabilidad.

Flujo obtenido codificado	Temperatura obtenida codificada	Flujo descodificado (mL/min)	Temperatura descodificada (°C)
-0.81290	-1.156970	0.64	29.06

En cuanto a las condiciones propuestas de flujo, el valor de 0.64 mL/min resulta poco aplicable a nivel práctico pues teóricamente al disminuir la velocidad de flujo, la resolución y simetría de los picos disminuiría; mientras que la posibilidad de coelución y otros problemas analíticos aumentarían (Afsah-Hejri et al., 2012; Dong, 2006). A nivel práctico, no se obtuvo un cromatograma adecuado (Figura 11) aplicando las condiciones propuestas e incluso pareciera que esta velocidad de flujo tan baja reduce al máximo la elución de los compuestos, que empiezan a eluir sólo al final de la corrida analítica que corresponde al lavado con acetonitrilo. Debido a esto, se realizó una corrida un acorde al punto central del CCD obteniendo los cromatogramas en la Figura 12.

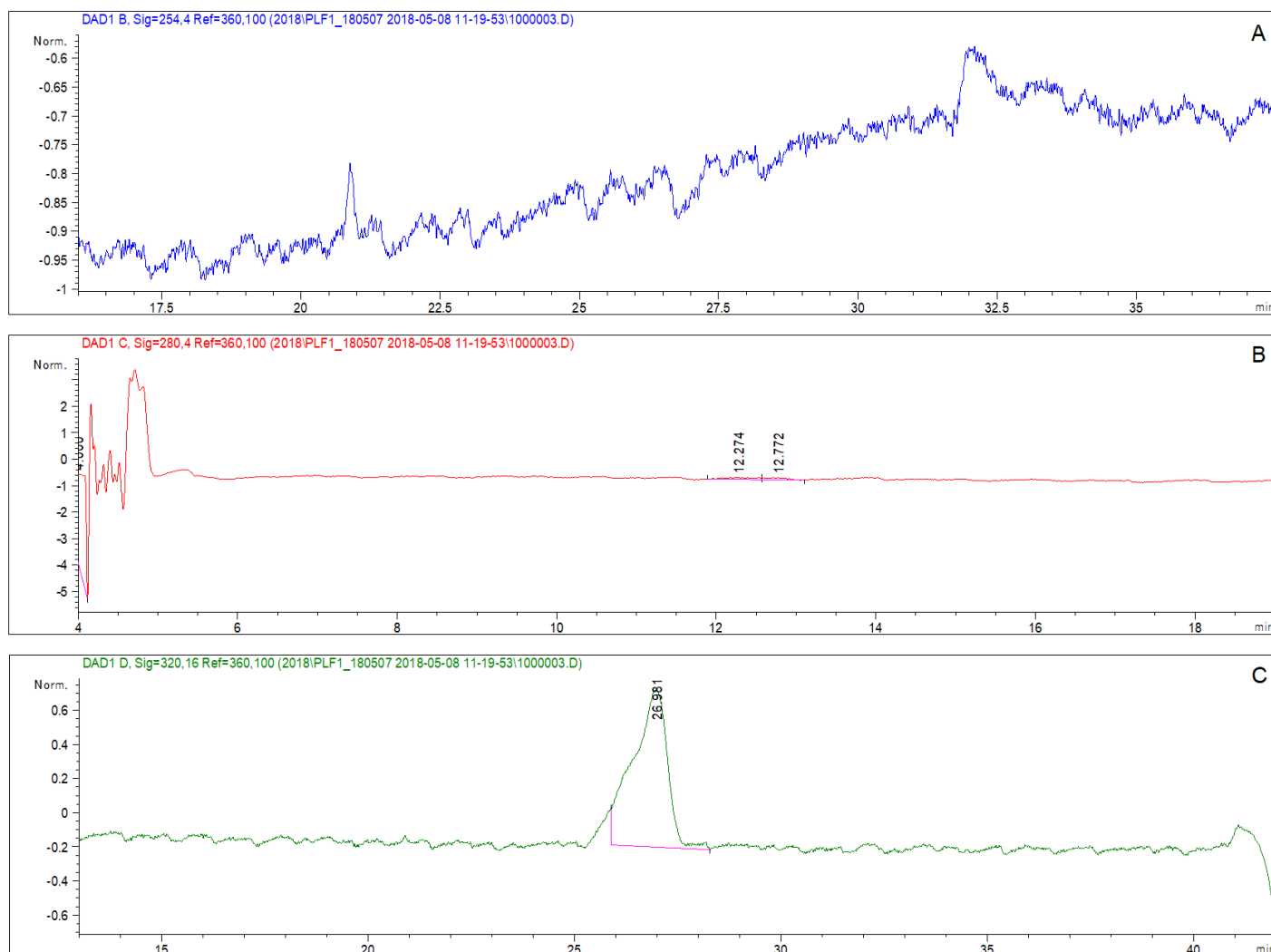


Figura 11. Cromatogramas obtenidos de los estándares a 1 ppm con las condiciones propuestas por el test de deseabilidad (0.64 mL/min y 29.06°C). A) a 254 nm. B) a 280 nm. C) a 320 nm.

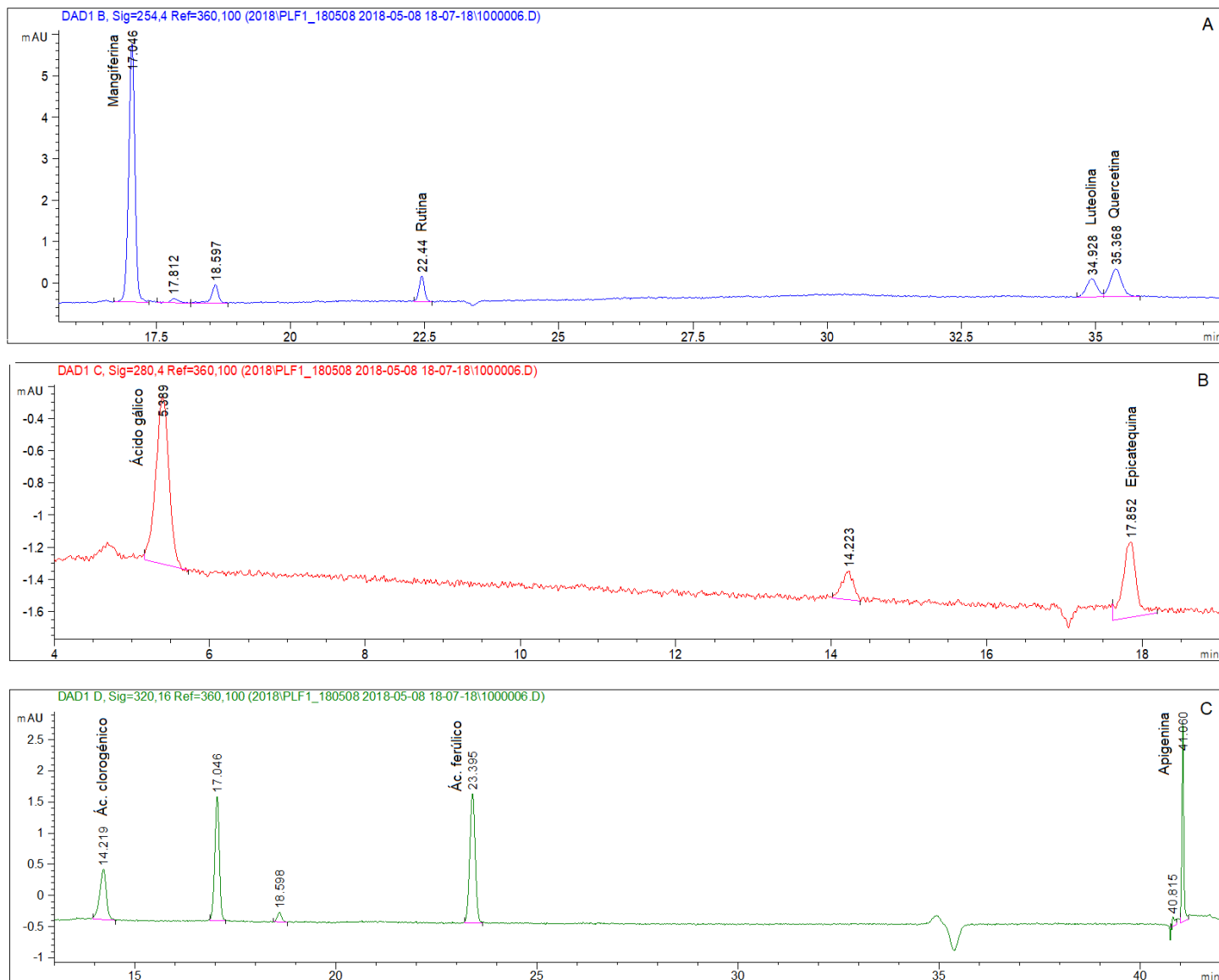


Figura 12. Cromatogramas obtenidos de los estándares a 1ppm usando el punto central del CCD (1 mL/min y 30°C). A) a 254 nm. B) a 280 nm. C) a 320 nm.

3.5. Método de extracción de polifenoles

Luego de la revisión de literatura, se optó por seguir principalmente la metodología de extracción propuesta por De Paepe et al. 2013, modificada en base a las metodologías propuestas por Gómez-Caravaca et al., 2016; Gómez-Romero, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2010; Palafox-Carlos et al., 2012; Ran et al., 2016.

El procedimiento modificado que fue puesto en marcha se describe a continuación:

1. Pesar 0.5 g de muestra liofilizada en dos tubos cónicos de polietileno por separado (E1 y E2)
2. Agregar 5 mL de la mezcla metanol/agua 20:80 (v/v) en el tubo E1
3. Agregar 5 mL de metanol en el tubo E2
4. Agitar ambos tubos, E1 y E2, con un homogeneizador vórtex por 5 min, seguido de ultrasonificación por 60 min a temperatura ambiente, mezclando cada 5 minutos en el vórtex.
5. Centrifugar E1 y E2 a 3000 rpm por 15min a 4°C
6. Recolectar una alícuota de 2 mL de cada uno de los sobrenadantes de E1 y E2 y unirlos en otro tubo (ET) en una proporción 50:50
7. Mezclar ET usando un vórtex a alta velocidad por 5 min
8. Centrifugar ET a 4000 rpm por 15 min a 4°C
9. Recolectar 2 mL del sobrenadante de ET en un tubo ámbar o cubierto con papel aluminio
10. Secar bajo una corriente de nitrógeno gaseoso a 35°C (con baño maría o baño seco) para acelerar el secado
11. Almacenar el extracto seco a -20°C hasta su análisis
12. Para inyectarlo al sistema de HPLC, reconstituir el extracto seco con 2 mL de metanol, mezclar y filtrar con filtros de jeringa de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro.

El procedimiento recomendable de extracción es dependiente de la naturaleza del analito a analizar (fenoles totales, clases como flavononas, o compuestos específicos como ácido clorogénico), de la matriz que se va a analizar (tipo de



fruta, cáscara, semilla), y del estado físico (si es líquido se puede inyectar directamente) (Antolovich et al., 2000). Igualmente se debe tener en consideración las necesidades del análisis y el entorno donde se realice los experimentos (disponibilidad de equipos e insumos) (Snyder et al., 1997). Teniendo en cuenta la diversidad estructural de los compuestos fenólicos, se aplicó la combinación de dos extractos que usaban solventes que variaban ligeramente en su polaridad. El orden descendente de polaridad de los solventes metanol/agua 20:80 (v/v) y metanol, aseguró la extracción de una amplia gama de compuestos (Evans et al., 2009; Garcia-Salas et al., 2010). Los métodos analizados tomaban de 30 minutos a 2 horas de sonicación para la extracción, por eso se decidió por la de 60 minutos, para asegurar la extracción completa de los compuestos y para optimizar el tiempo. Todo el proceso de extracción se realizó protegido de la luz para evitar la degradación y modificación de algunos de los compuestos por su fotosensibilidad. Por otro lado, se evitó la oxidación de los compuestos con el uso de una corriente de nitrógeno gaseoso. Para asegurar la exclusión de cualquier material particulado, se filtró el extracto previo a su inyección en el sistema HPLC.

En el desarrollo del método, se observó que al agregar el solvente metanol/agua 20:80 v/v se formaba un coloide de aspecto gelatinoso. Esto podría deberse a algunos carbohidratos de la matriz, principalmente la pectina (uno de los compuestos hidro-coloidales que se encuentra en las paredes de las células vegetales, especialmente en la cáscara de frutas) que se extrae con agua y precipita con alcohol (Pegg, 2012; Smith, 2003). La homogenización con vórtex permitió la mezcla correcta antes y durante la sonicación de los tubos. El uso de temperaturas bajas al momento de la centrifugación permitió una sedimentación más adecuada, lo que permitió una recolección más limpia del sobrenadante. Al mezclar los dos sobrenadantes de los diferentes solventes, existió nuevamente una precipitación, para lo cual fue necesario una nueva etapa de centrifugación. El uso de un baño seco a 35°C para los tubos permitió acelerar el proceso de secado, una hora usando el baño en comparación a alrededor de seis o siete horas sin su uso.

3.6. Aplicación del método optimizado

3.6.1. Descripción del método final y parámetros analíticos

Se optó por utilizar el punto central del diseño central compuesto (velocidad de flujo 1 mL/min y temperatura de la columna 30°C) como método final. Las demás condiciones fueron volumen de inyección de 10 μ L, fase móvil A de agua/ácido acético 0.3% v/v, fase móvil B de acetonitrilo/agua 50:50 v/v + ácido acético 0.3%, fase móvil C de acetonitrilo, gradiente de inicio de 10% B hasta 2 min, seguido de un incremento al 55% B hasta los 27 min, manteniéndolo hasta los 37 min, 100% C desde los 39 min, manteniéndolo hasta los 43 min, para finalmente regresar a las condiciones iniciales de 10% B a los 43 min mantenidos por 0.5 min adicionales para equilibración (Figura 13).

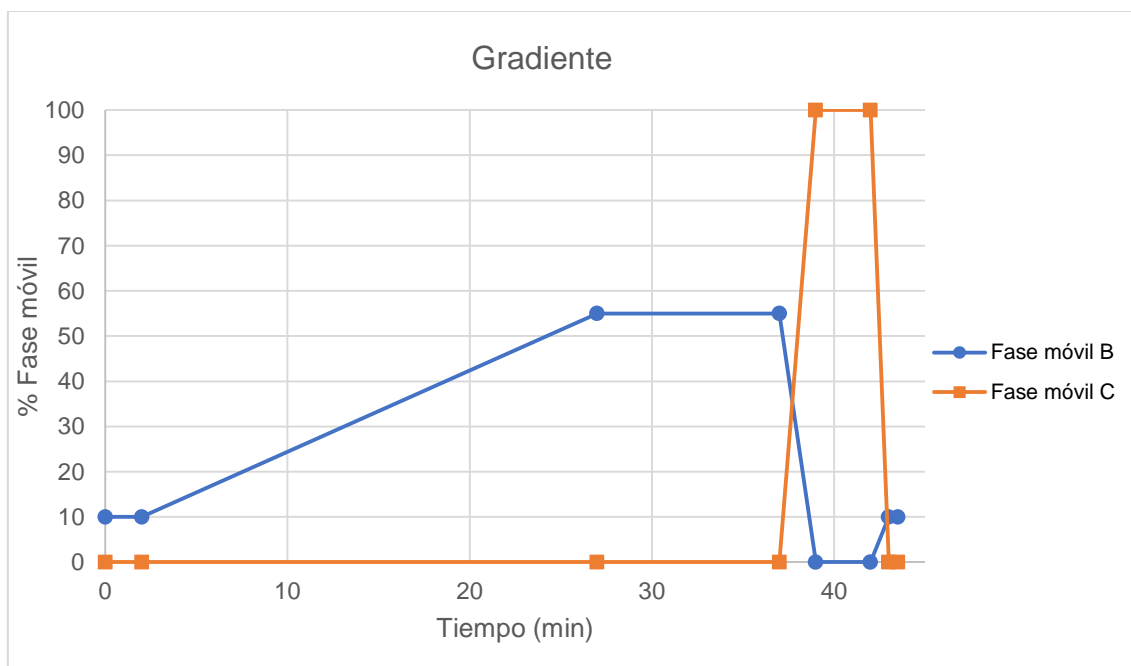


Figura 13. Gradiente de fase móvil en relación con el tiempo del método final.

Dado que a las condiciones propuestas por el test de deseabilidad no fueron propicias a nivel práctico (obteniendo cromatogramas sin elución de picos), se llevó a cabo la aplicación del método con las condiciones del punto central del diseño central compuesto. A partir de este método se obtuvieron los tiempos de retención de cada estándar para el experimento final (Tabla 14), aplicando una ventana de tiempo de retención de 2.5%.

Tabla 14. Tiempo de retención de los estándares.

Estándar	Longitud de onda óptima (nm)	tR (min)	Ventana de tR (min)
Ácido gálico	280	5.45	5.31 - 5.58
Ácido clorogénico	320	14.23	13.88 - 14.59
Mangiferina	254	17.05	16.63 - 17.48
Epicatequina	280	17.83	17.38 - 18.27
Rutina	254	22.46	21.89 - 23.02
Ácido ferúlico	320	23.40	22.82 - 23.99
Luteolina	254	34.87	33.99 - 35.74
Quercetina	254	35.31	34.43 - 36.19
Apigenina	320	41.06	40.04 - 42.09

Bajo estas condiciones no se observó coelución de compuestos, permitiendo su correcta identificación. Para los analitos con tiempos de retención muy próximos, la identificación fue posible gracias a la respuesta instrumental característica de cada compuesto. Los tiempos de retención de la rutina y ácido ferúlico están alrededor de los 22-23 minutos, pero la primera presenta una absorbancia a solo 254 nm y el segundo a 320 y 280 nm; mientras que la luteolina y quercetina presentan absorbancia a 254 nm, pero esta última presenta una respuesta instrumental inversa tanto a los 280 y 320 nm (ver Tabla 7 y Figura 12). En este contexto, una ventana de tiempo de retención pequeña (de 2.5%) ayuda a evitar errores en la identificación de los picos cromatográficos.

El cromatograma resultante se obtuvo con buena resolución, sin ruido en la línea de base, picos definidos y separados. Por esta razón se decidió usar las condiciones del método para la creación de la curva de calibración, determinar límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), y para la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos del mango. La Figura 14 muestra las curvas de calibración de los estándares con sus valores de R^2 (0.9934 - 0.9999) y las ecuaciones de la recta de cada compuesto. Los parámetros de optimización del método analítico se presentan en la Tabla 15.



Tabla 15. Parámetros de optimización del método analítico de polifenoles.

Parámetro	Unidad	Polifenoles								
		Mangiferina	Rutina	Luteolina	Quercetina	Ácido gálico	Epicatequina	Ácido clorogénico	Ácido ferúlico	Apigenina
LOD	ng/mL	10.91	18.92	73.69	68.85	25.99	52.85	17.24	3.41	25.16
LOQ	ng/mL	21.82	37.84	147.39	137.71	51.97	105.7	34.48	6.81	50.32
Rango lineal	ng/mL	50-500	50-500	100-1000	100-1000	50-500	100-1000	50-500	50-500	49.7-497
Linealidad (R ²)	-	0.9955	0.9984	0.9934	0.9943	0.9970	0.9966	0.9987	0.9999	0.9972

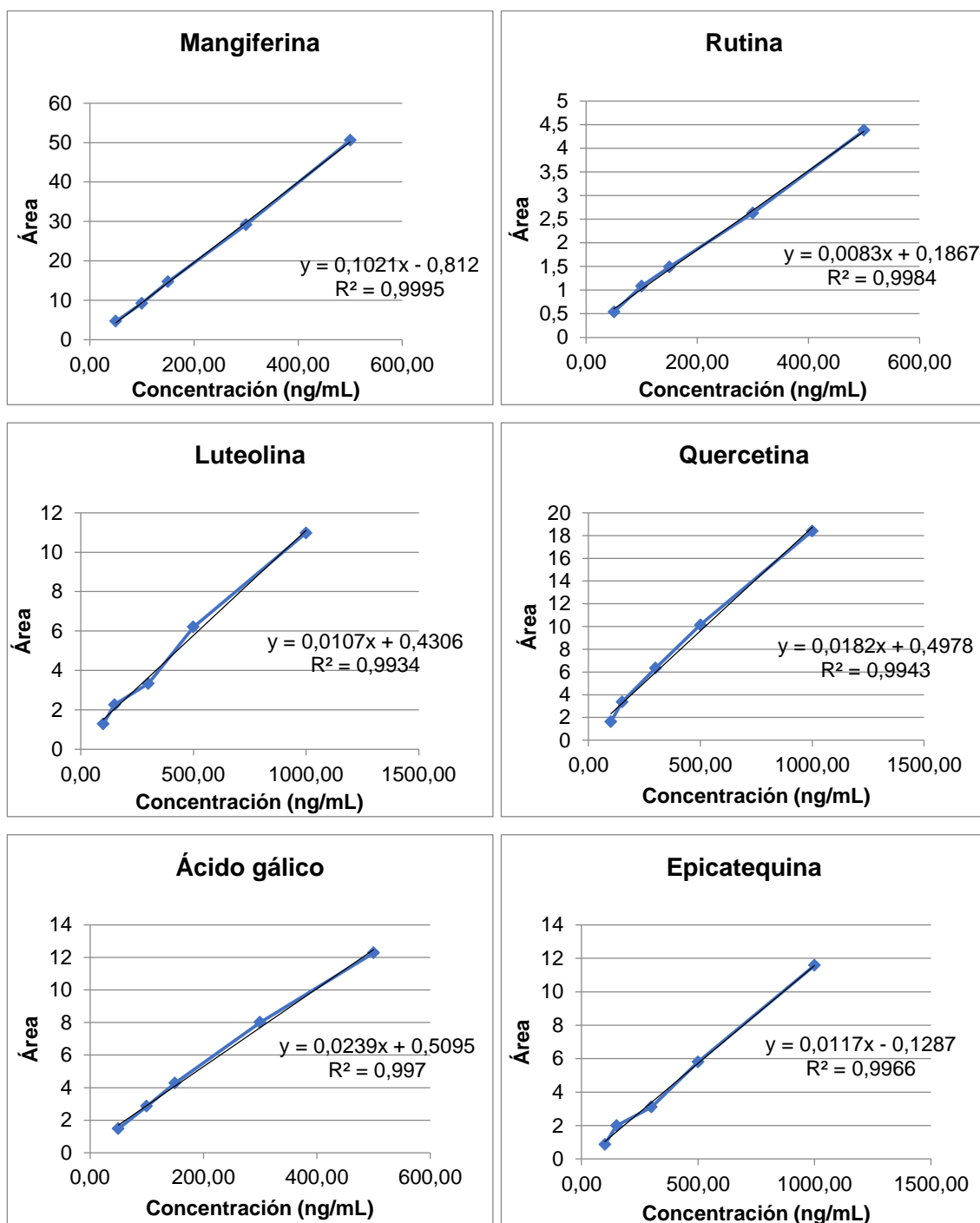


Figura 14. Curvas de calibración de estándares con ecuación de la curva y R^2 .

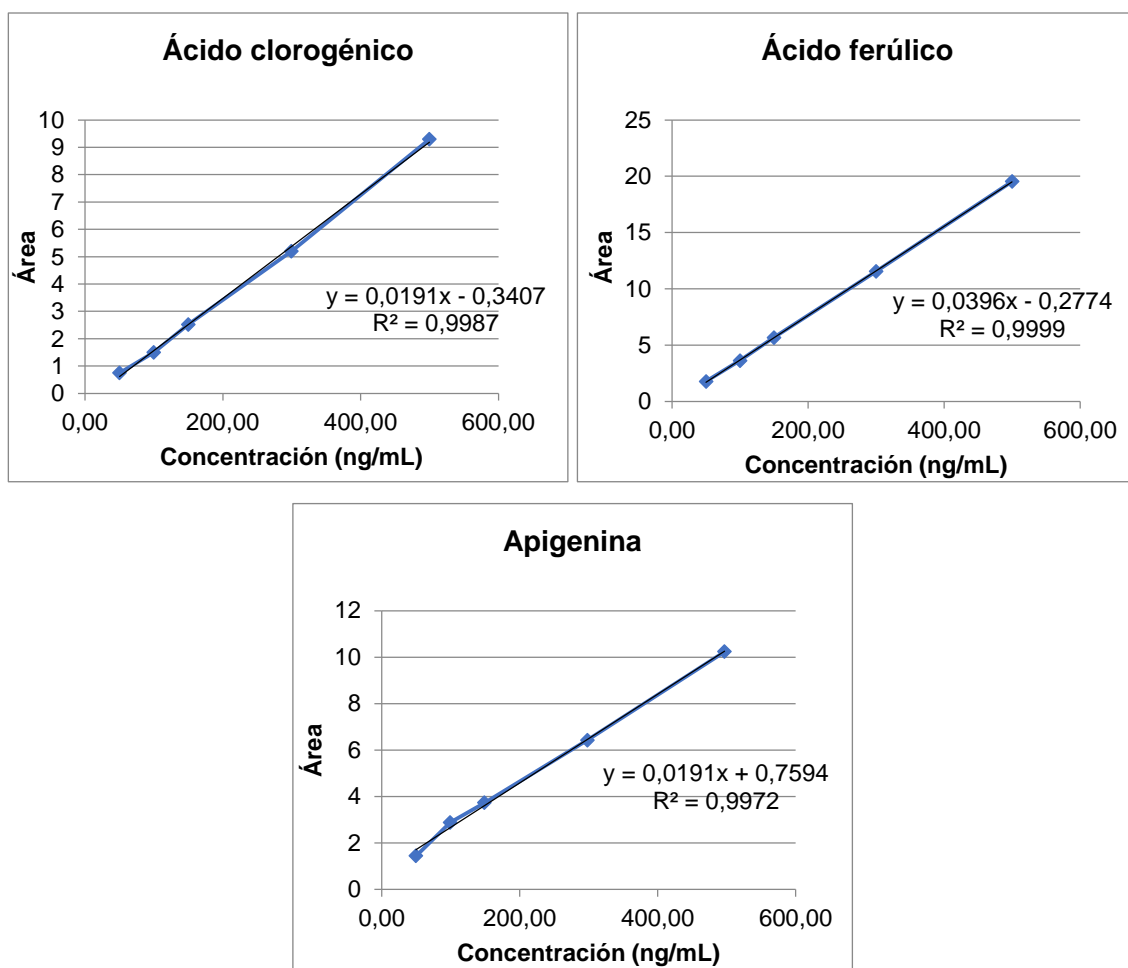


Figura 14. Continuación. Curvas de calibración de estándares con ecuación de la curva y R^2 .

3.6.2. Aplicabilidad de método: análisis de polifenoles en extractos de mango

En este estudio se aplicaron los métodos optimizados para el análisis de muestras de mango liofilizadas. En esta matriz de fruta se detectaron y cuantificaron mangiferina, rutina, ácido gálico y clorogénico (Tabla 16) con una variación aceptable (4.4 - 7.6 %CV). El cromatograma resultante de este análisis se presenta en la Figura 15.

Tabla 16. Cuantificación de polifenoles en mango.

Estándar	Tiempo retención (min)	X (µg/kg)	SD	%CV
Mangiferina	17.04	912.5	69.4	7.6
Rutina	22.40	5308.4	291.5	5.5
Ácido gálico	5.43	32028.0	1401.7	4.4
Ácido clorogénico	14.12	1018.1	52.9	5.2

Nota: Valores expresados en µg/kg utilizando un factor de 5 derivado del proceso de extracción

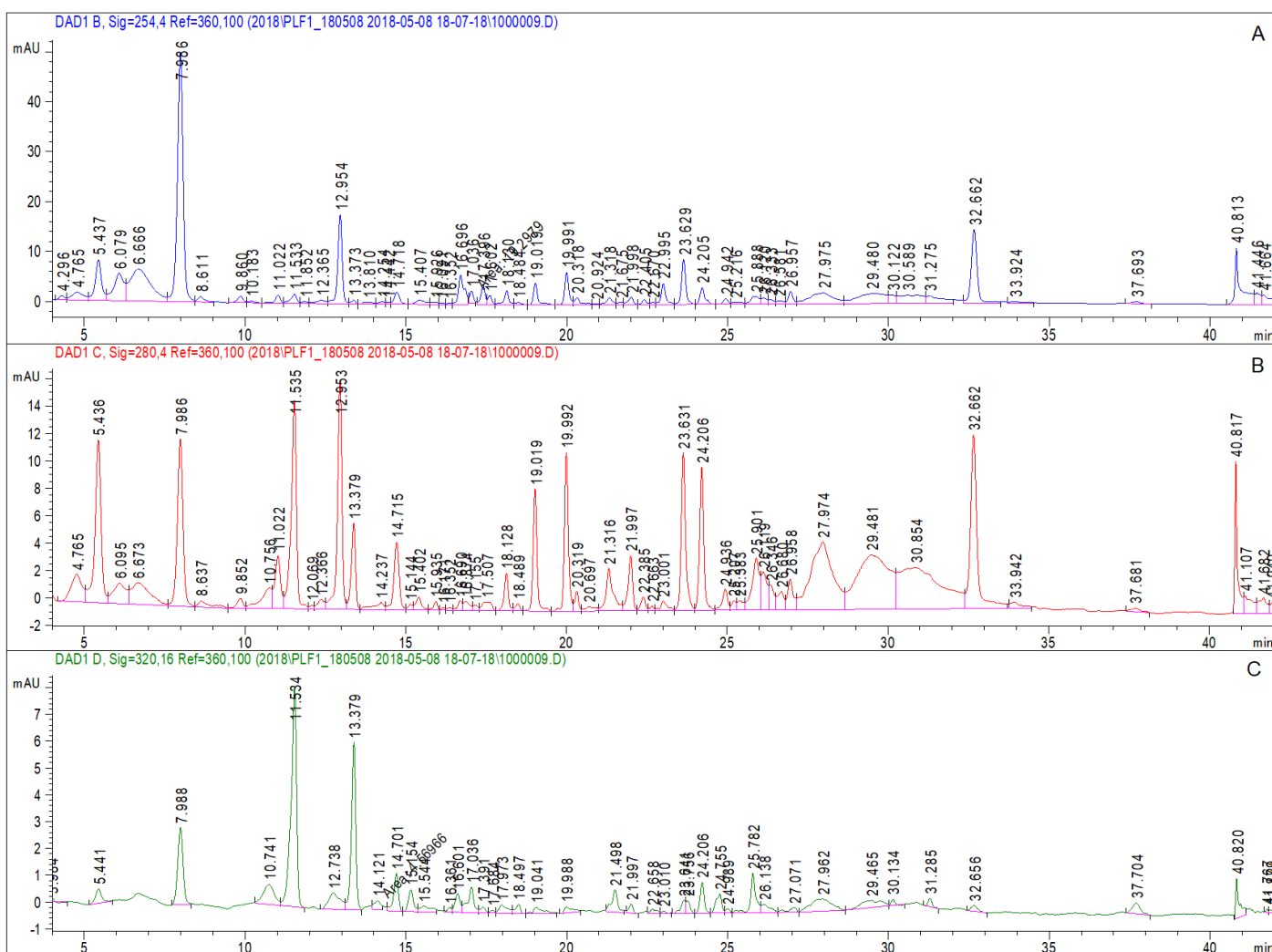


Figura 15. Cromatogramas obtenidos del mango. A) a 254 nm. B) a 280 nm. C) a 320 nm.



En los cromatograma del análisis de polifenoles en mango no se observó demasiado ruido ni interferencias (coelución de picos, picos dobles, alargamiento de picos, bases de línea por arriba de cero), por lo que se comprobó la aplicabilidad del método de análisis desarrollado (Dong, 2006; Kromidas, 2006; Meyer, 2013), así como la utilidad del método de extracción en esta matriz de fruta.

En cuanto a los polifenoles encontrados, la mangiferina, quercetina, rutina, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogénico, apigenina, y epicatequina han sido descritos anteriormente en el mango (Abbasi et al., 2015; Gómez-Caravaca et al., 2016; Masibo & He, 2008; Palafox-Carlos et al., 2012; Poovarodom et al., 2010). Además se ha descrito que en esta fruta la luteolina se encuentra en forma glicosilada, principalmente en forma de hexósido (Berardini, Carle, & Schieber, 2004). En el presente estudio se identificaron y cuantificaron 4 de los 9 compuestos usados en la optimización del método analítico, siendo éstos mangiferina, rutina, ácido gálico y ácido clorogénico. La principal causa de no encontrar todos los compuestos analizados podría estar relacionada a que la estructura de los polifenoles varían constantemente por sus vías metabólicas dando paso a metilaciones o hidroxilaciones, donación de anillos fenólicos enteros, y conjugación con glicósidos (Saltveit, 2017). Además, se debe considerar que estas vías están controladas por innumerables factores como diferencias entre especies, disponibilidad de enzimas e incluso cambios en cualquier momento pre y post-cosecha (temperatura, luz, insectos, etc.) (Annie Ewané et al., 2013; Evans et al., 2009). Por lo tanto, el método de extracción potencialmente podría mejorarse en función de estas variables.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

El objetivo de este estudio fue desarrollar y optimizar un método de HPLC-DAD para el análisis de polifenoles en frutas, específicamente en una matriz de mango liofilizado. El método cromatográfico se optimizó para el análisis de nueve polifenoles usualmente constituyentes del mango mediante la aplicación de un diseño factorial, seguido de un diseño central compuesto y un test de deseabilidad. Las variables de optimización fueron velocidad de flujo, temperatura de columna y acidificación de la fase móvil. Por la falta de significancia de esta última en el diseño factorial, las pruebas posteriores solo se realizaron con la velocidad de flujo y temperatura de columna.

La modificación de las variables analizadas mostró una influencia variada sobre la eficiencia cromatográfica de los compuestos, permitiendo la observación del comportamiento de los polifenoles a diferentes condiciones cromatográficas experimentales. Sin embargo, la propuesta final de condiciones cromatográficas a partir de las pruebas de optimización (o puntos estacionarios) fue considerada de baja aplicabilidad a nivel práctico porque afectaba negativamente la resolución de los picos cromatográficos y ponía en riesgo la estabilidad de la columna analítica. Los modelos fueron diseñados en base a la eficiencia como variable respuesta, no obstante, el criterio principal de la selección del método fue la resolución de los picos cromatográficos. Esto conllevó a escoger como método final a uno de los experimentos del punto central, lo que recalca la importancia de la selección de parámetros cromatográficos en base al criterio del analista y a la revisión bibliográfica correspondiente.

Por otro lado, se desarrolló el método de extracción a través de la revisión bibliográfica para el análisis de polifenoles en muestras de mango liofilizado. Los cromatogramas obtenidos presentaron picos resueltos y sin problemas aparentes, lo que denota la aplicabilidad del método analítico optimizado.



Al evaluar el contenido de polifenoles en las muestras de mango, se logró identificar y cuantificar 4 de los 9 compuestos fenólicos analizados (mangiferina, rutina, ácido gálico y ácido clorogénico). Este hallazgo sugiere la variabilidad de dichos compuestos en la fruta analizada conforme a lo descrito en la literatura. Sin embargo, resultaría necesario corroborar que el método aplicado tiene la capacidad de extraer todos los polifenoles presentes en la matriz con experimentos adicionales de recuperación; así como también la aplicabilidad del método en otras matrices vegetales utilizando las metodologías desarrolladas como base de futuros estudios.

4.2. Recomendaciones

A partir del estudio realizado se recomienda:

- Realizar la validación de los métodos. Más específicamente, se necesitan pruebas de precisión inter-día y pruebas de recuperación para obtener la variabilidad del análisis entre días y para la corroboración de la efectividad del método de análisis y del método de extracción. Del mismo modo, se necesitan analizar otras matrices vegetales para corroborar la aplicabilidad del método en éstas.
- Usar esta investigación para la aplicación del método cromatográfico para identificar y cuantificar polifenoles en alimentos, de ese modo contribuyendo a diferentes investigaciones de salud y nutrición. Igualmente, se lo puede utilizar para el desarrollo metodologías afines como cromatografía líquida de ultra alta resolución.



REFERENCIAS

- Abbasi, A., Guo, X., Fu, X., Zhou, L., Chen, Y., Zhu, Y., ... Liu, R. (2015). Comparative Assessment of Phenolic Content and in Vitro Antioxidant Capacity in the Pulp and Peel of Mango Cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 13507–13527. <https://doi.org/10.3390/ijms160613507>
- Afsah-Hejri, L., Jinap, S., & Mirhosseini, H. (2012). Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. *Food Control*, 23(1), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.020>
- Annie Ewané, C., Lepoivre, P., de Bellaire, L. de L., & Lassois, L. (2013). Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *BASE*, 16(3), 393–404.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst*, 125(5), 989–1009. <https://doi.org/10.1039/b000080i>
- Becerra, M., Zitzumbo Guzmán, R., Domínguez Domínguez, J., García, J., & Alonso Romero, S. (2014). Aplicación de la función de deseabilidad para optimizar un producto vulcanizado. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 37(1), 85–94.
- Berardini, N., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. ?Tommy Atkins?) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(19), 2208–2216. <https://doi.org/10.1002/rcm.1611>



Bliesner, D. M. (2006). *Validating chromatographic methods: a practical guide*. Hoboken, N.J: Wiley.

Chicaiza Guamán, S. (2015). *Diseño y caracterización de un néctar en base de Uvilla (Physalis peruviana L.) con chirimoya (Annona cherimola Mill.) como fuente de antioxidantes naturales*. (Trabajo de investigación para optar por el grado de Químico de Alimentos). UCE, Quito. Recuperado de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/3493/1/Tesis%20de%20pregrado%20Dise%C3%B1o%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20un%20n%C3%A9ctar%20a%20base%20de%20uvilla%20%28Physalis%20peruviana%20L%29%20con%20chirimoya%20%28Annona%20Cher~1.pdf>

de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>

del Cornò, M., Scazzocchio, B., Masella, R., & Gessani, S. (2016). Regulation of Dendritic Cell Function by Dietary Polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 737–747. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.713046>

Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience.

Evans, W. C., Evans, D., & Trease, G. E. (2009). *Trease and Evans pharmacognosy* (16th ed). Edinburgh ; New York: Saunders/Elsevier.



- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., da Silva, E. G. P., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M., ... Neto, B. B. (2007). Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.051>
- García, I., & Cárdenas, J. (2016). *Polifenoles en alimentos. Biodisponibilidad y Métodos Analíticos de Evaluación del Potencial Antioxidante (Primera)*. Guayaquil: El Telégrafo.
- García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826.
<https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Gómez-Caravaca, A. M., López-Cobo, A., Verardo, V., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016). HPLC-DAD-q-TOF-MS as a powerful platform for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part of mango and its by-products (peel, seed, and seed husk): Liquid phase separations. *ELECTROPHORESIS*, 37(7–8), 1072–1084.
<https://doi.org/10.1002/elps.201500439>
- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71(16), 1848–1864.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.002>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview: Phenolic compounds



- in fruits. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hanrahan, G., & Lu, K. (2006). Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3–4), 141–151. <https://doi.org/10.1080/10408340600969478>
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18(3), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kimura, M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1999). Sources of errors in the quantitative analysis of food carotenoids by HPLC. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(3 Suppl 1), 58S-66S.
- Kromidas, S. (Ed.). (2006). *HPLC made to measure: a practical handbook for optimization*. Weinheim: WILEY-VCH.
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1–2), 3–40. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)
- Masibo, M., & He, Q. (2008). Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4), 309–319. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00047.x>
- Meyer, V. R. (2013). *Pitfalls and errors of HPLC in pictures* (3a ed.). Weinheim: Wiley-VCH.



- Motilva, M.-J., Serra, A., & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1292, 66–82. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.012>
- Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (2013). *Food analysis by HPLC*. Boca Raton, FL: CRC Press. Recuperado de <http://www.crcnetbase.com/isbn/9781439830857>
- OMS. (2012). *Fomento del consumo mundial de frutas y verduras*. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/>
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2012). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*, 135(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.103>
- Pegg, A. M. (2012). The application of natural hydrocolloids to foods and beverages. En *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* (pp. 175–196). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095725.1.175>
- Poovarodom, S., Haruenkit, R., Vearasilp, S., Namiesnik, J., Cvikrová, M., Martincová, O., ... Gorinstein, S. (2010). Comparative characterisation of durian, mango and avocado. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(5), 921–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02227.x>



- Ran, J., Sun, H., Zhu, M., Chen, J., & Zhao, R. (2016). Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for the Quantitative Determination of Ten Polyphenols Extracted from Apple Peel. *Journal of AOAC International*, 99(2), 481–488. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0240>
- Ravisankar, P., Pravallika, D., & Navya Sri, D. (2015). A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal of Pharmacy*, 5(10), 7–19.
- Ricco, R. A., Agudelo, I. J., & Wagner, M. L. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 52(2), 161–174.
- Saltveit, M. E. (2017). Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. En E. M. Yahia (Ed.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals* (pp. 115–124). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch5>
- Smith, D. A. (2003). JAMS AND PRESERVES | Methods of Manufacture. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2da ed., pp. 3409–3415). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00660-X>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC method development* (2nd ed). New York: Wiley.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. L. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Dordrecht: Springer.



Wang, X., Carr, P., & Stoll, D. (2010, noviembre). A Simple Approach to Performance Optimization in HPLC and Its Application in Ultrafast Separation Development. *LCGC North America*, 28(11), 932–942.

Yahia, E. M. (Ed.). (2017). *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health* (2nd edition). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd.



ANEXO 1. DISEÑO FACTORIAL 2^3

Se encuentra como archivo hoja de datos (XLSX) en el CD adjunto.



ANEXO 2. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO (SOFTWARE R)

MANGIFERIN

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ FO(X1, X2) + TWI(X1, X2), data = CR1)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	320438	10238	31.2984	6.21e-06 ***
X1	-54108	14479	-3.7370	0.02017 *
X2	-31005	14479	-2.1414	0.09893 .
X1:X2	-10242	14479	-0.7074	0.51838

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.8265, Adjusted R-squared: 0.6963

F-statistic: 6.35 on 3 and 4 DF, p-value: 0.05308

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	1.5556e+10	7777992199	9.2754	0.03146
TWI(X1, X2)	1	4.1958e+08	419579545	0.5004	0.51838
Residuals	4	3.3542e+09	838557311		
Lack of fit	1	1.5856e+09	1585600096	2.6895	0.19954
Pure error	3	1.7686e+09	589543049		

Stationary point of response surface:

X1	X2
-3.027321	-5.283039

Stationary point in original units:

FR	Temp
0.3945357	-1.6982331

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 5120.91 -5120.91

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.7071068	-0.7071068
x2	0.7071068	-0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	308496.0	9626.1	32.0480	6.136e-08 ***
X1	-60246.6	6350.5	-9.4870	7.815e-05 ***
X2	-28577.3	6350.5	-4.5000	0.004104 **
X1:X2	-10241.8	9929.9	-1.0314	0.342119
X1^2	6598.4	5857.5	1.1265	0.302992
X2^2	12485.5	5857.5	2.1315	0.077047 .



Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.9509, Adjusted R-squared: 0.9099
F-statistic: 23.22 on 5 and 6 DF, p-value: 0.0007362

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	4.3485e+10	2.1742e+10	55.1262	0.0001375
TWI(X1, X2)	1	4.1958e+08	4.1958e+08	1.0638	0.3421188
PQ(X1, X2)	2	1.8851e+09	9.4257e+08	2.3898	0.1724425
Residuals	6	2.3665e+09	3.9441e+08		
Lack of fit	3	5.9785e+08	1.9928e+08	0.3380	0.8015926
Pure error	3	1.7686e+09	5.8954e+08		

Stationary point of response surface:

x1	x2
7.999894	4.425579

Stationary point in original units:

FR	Temp
2.599979	56.553476

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 15448.536 3635.296

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.5008262	-0.8655479
x2	0.8655479	-0.5008262



RUTIN

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	828369	25636	32.3128	5.469e-06 ***
X1	-10421	36255	-0.2874	0.78805
X2	158854	36255	4.3816	0.01186 *
X1:X2	121463	36255	3.3503	0.02856 *

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.8841, Adjusted R-squared: 0.7971
 F-statistic: 10.17 on 3 and 4 DF, p-value: 0.0242

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	1.0137e+11	5.0686e+10	9.6406	0.02952
TWI(X1, X2)	1	5.9013e+10	5.9013e+10	11.2243	0.02856
Residuals	4	2.1030e+10	5.2576e+09		
Lack of fit	1	2.2163e+09	2.2163e+09	0.3534	0.59405
Pure error	3	1.8814e+10	6.2714e+09		

Stationary point of response surface:

	X1	X2
	-1.3078389	0.0857984

Stationary point in original units:

	FR	Temp
	0.7384322	30.5147904

Eigenanalysis:

eigen() decomposition
 \$values
 [1] 60731.53 -60731.53

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	0.7071068	-0.7071068
x2	0.7071068	0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	854092.8	62758.5	13.6092	9.771e-06 ***
X1	-38514.5	41402.8	-0.9302	0.3881
X2	56460.4	41402.8	1.3637	0.2216
X1:X2	121463.1	64739.5	1.8762	0.1097
X1^2	-64108.9	38189.1	-1.6787	0.1442
X2^2	-7744.2	38189.1	-0.2028	0.8460

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.6047, Adjusted R-squared: 0.2752
 F-statistic: 1.835 on 5 and 6 DF, p-value: 0.2403

Analysis of Variance Table



Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	4.5684e+10	2.2842e+10	1.3625	0.3252
TWI(X1, X2)	1	5.9013e+10	5.9013e+10	3.5201	0.1097
PQ(X1, X2)	2	4.9155e+10	2.4578e+10	1.4660	0.3031
Residuals	6	1.0059e+11	1.6765e+10		
Lack of fit	3	8.1775e+10	2.7258e+10	4.3464	0.1293
Pure error	3	1.8814e+10	6.2714e+09		

Stationary point of response surface:

X1	X2
-0.4904160	-0.2006011

Stationary point in original units:

FR	Temp
0.9019168	28.7963935

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 31025.4 -102878.5

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.5380825	-0.8428922
x2	-0.8428922	0.5380825



GALIC ACID

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ FO(X1, X2) + TWI(X1, X2), data = CR1)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	24221.5	1031.4	23.4839	1.949e-05	***
X1	-6595.6	1458.6	-4.5217	0.01064	*
X2	-2254.2	1458.6	-1.5454	0.19713	
X1:X2	6430.1	1458.6	4.4083	0.01162	*

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.9135, Adjusted R-squared: 0.8487
F-statistic: 14.09 on 3 and 4 DF, p-value: 0.0136

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	194332834	97166417	11.4173	0.02222
TWI(X1, X2)	1	165384790	165384790	19.4331	0.01162
Residuals	4	34041866	8510467		
Lack of fit	1	3421674	3421674	0.3352	0.60320
Pure error	3	30620193	10206731		

Stationary point of response surface:

	X1	X2
	0.350575	1.025735

Stationary point in original units:

	FR	Temp
	1.070115	36.154408

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 3215.05 -3215.05

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	0.7071068	-0.7071068
x2	0.7071068	0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	23595.52	1875.94	12.5780	1.546e-05	***
X1	-6827.76	1237.59	-5.5170	0.001491	**
X2	694.24	1237.59	0.5610	0.595138	
X1:X2	6430.10	1935.15	3.3228	0.015949	*
X1^2	-108.40	1141.52	-0.0950	0.927439	
X2^2	1297.60	1141.52	1.1367	0.299005	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.8783, Adjusted R-squared: 0.7769
F-statistic: 8.662 on 5 and 6 DF, p-value: 0.01025



Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(x1, x2)	2	460640042	230320021	15.3759	0.004351
TWI(x1, x2)	1	165384790	165384790	11.0409	0.015949
PQ(x1, x2)	2	22706929	11353464	0.7579	0.508760
Residuals	6	89875777	14979296		
Lack of fit	3	59255584	19751861	1.9352	0.300652
Pure error	3	30620193	10206731		

Stationary point of response surface:

x1	x2
-0.5293257	1.0439960

Stationary point in original units:

FR	Temp
0.8941349	36.2639760

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 3885.614 -2696.410

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	0.6270518	-0.7789776
x2	0.7789776	0.6270518



EPICATECHIN

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ FO(X1, X2) + TWI(X1, X2), data = CR1)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	331401	47993	6.9052	0.002307 **
X1	-131417	67873	-1.9362	0.124917
X2	-94955	67873	-1.3990	0.234375
X1:X2	112631	67873	1.6595	0.172363

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.679, Adjusted R-squared: 0.4382
F-statistic: 2.82 on 3 and 4 DF, p-value: 0.1711

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	1.0515e+11	5.2574e+10	2.8531	0.1698
TWI(X1, X2)	1	5.0743e+10	5.0743e+10	2.7538	0.1724
Residuals	4	7.3707e+10	1.8427e+10		
Lack of fit	1	6.2118e+09	6.2118e+09	0.2761	0.6356
Pure error	3	6.7495e+10	2.2498e+10		

Stationary point of response surface:

	X1	X2
	0.8430562	1.1667905

Stationary point in original units:

	FR	Temp
	1.168611	37.000743

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 56315.68 -56315.68

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	0.7071068	-0.7071068
x2	0.7071068	0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	316183.3	63136.4	5.0079	0.002433 **
X1	-79155.5	41652.1	-1.9004	0.106112
X2	-67221.3	41652.1	-1.6139	0.157682
X1:X2	112631.4	65129.3	1.7293	0.134476
X1^2	4893.0	38419.0	0.1274	0.902818
X2^2	-2877.6	38419.0	-0.0749	0.942729

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.6062, Adjusted R-squared: 0.2781
F-statistic: 1.848 on 5 and 6 DF, p-value: 0.238



Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	1.0547e+11	5.2735e+10	3.1080	0.1185
TWI(X1, X2)	1	5.0743e+10	5.0743e+10	2.9906	0.1345
PQ(X1, X2)	2	5.2211e+08	2.6105e+08	0.0154	0.9848
Residuals	6	1.0180e+11	1.6967e+10		
Lack of fit	3	3.4309e+10	1.1436e+10	0.5083	0.7038
Pure error	3	6.7495e+10	2.2498e+10		

Stationary point of response surface:

X1	X2
0.6299392	0.6480517

Stationary point in original units:

FR	Temp
1.125988	33.888310

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 57457.25 -55441.84

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.7310361	0.6823388
x2	-0.6823388	-0.7310361



CHLOROGENIC ACID

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ FO(X1, X2) + TWI(X1, X2), data = CR1)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	151370	7522	20.1237	3.599e-05 ***
X1	-30962	10638	-2.9106	0.04365 *
X2	-11449	10638	-1.0762	0.34240
X1:X2	-17604	10638	-1.6548	0.17330

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.7556, Adjusted R-squared: 0.5723
F-statistic: 4.123 on 3 and 4 DF, p-value: 0.1024

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	4358869219	2179434610	4.8150	0.08613
TWI(X1, X2)	1	1239559530	1239559530	2.7385	0.17330
Residuals	4	1810556139	452639035		
Lack of fit	1	1053994535	1053994535	4.1794	0.13349
Pure error	3	756561605	252187202		

Stationary point of response surface:

X1	X2
-0.6503544	-1.7588364

Stationary point in original units:

FR	Temp
0.8699291	19.4469818

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 8801.845 -8801.845

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.7071068	-0.7071068
x2	0.7071068	-0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	142687.0	11207.2	12.7318	1.441e-05 ***
X1	-29438.0	7393.5	-3.9816	0.007270 **
X2	-28277.0	7393.5	-3.8246	0.008714 **
X1:X2	-17603.7	11560.9	-1.5227	0.178665
X1^2	7304.5	6819.6	1.0711	0.325309
X2^2	3779.0	6819.6	0.5541	0.599519

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.85, Adjusted R-squared: 0.725
F-statistic: 6.8 on 5 and 6 DF, p-value: 0.01853



Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	1.6295e+10	8147648496	15.2401	0.004449
TWI(X1, X2)	1	1.2396e+09	1239559530	2.3186	0.178665
PQ(X1, X2)	2	6.4203e+08	321016494	0.6005	0.578483
Residuals	6	3.2077e+09	534618692		
Lack of fit	3	2.4512e+09	817050182	3.2399	0.180057
Pure error	3	7.5656e+08	252187202		

Stationary point of response surface:

X1	X2
-3.610807	-4.668798

Stationary point in original units:

FR	Temp
0.2778386	1.9872112

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 14518.345 -3434.902

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.7734247	-0.6338882
x2	0.6338882	-0.7734247



FERULIC ACID

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ FO(X1, X2) + TWI(X1, X2), data = CR1)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	458227.9	6401.1	71.5859	2.282e-07 ***
X1	-20915.7	9052.5	-2.3105	0.08199 .
X2	-14309.2	9052.5	-1.5807	0.18910
X1:X2	-5197.9	9052.5	-0.5742	0.59658

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.6712, Adjusted R-squared: 0.4247

F-statistic: 2.722 on 3 and 4 DF, p-value: 0.1789

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	2568885559	1284442779	3.9185	0.1142
TWI(X1, X2)	1	108070998	108070998	0.3297	0.5966
Residuals	4	1311165921	327791480		
Lack of fit	1	2237209	2237209	0.0051	0.9474
Pure error	3	1308928712	436309571		

Stationary point of response surface:

	X1	X2
	-2.752906	-4.023911

Stationary point in original units:

	FR	Temp
	0.4494189	5.8565324

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 2598.93 -2598.93

\$vectors

	[,1]	[,2]
X1	-0.7071068	-0.7071068
X2	0.7071068	-0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	459575.86	8221.65	55.8983	2.202e-09 ***
X1	-25835.35	5423.95	-4.7632	0.003116 **
X2	-16019.10	5423.95	-2.9534	0.025500 *
X1:X2	-5197.86	8481.16	-0.6129	0.562456
X1^2	252.49	5002.94	0.0505	0.961388
X2^2	-7165.90	5002.94	-1.4323	0.202019

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.8504, Adjusted R-squared: 0.7258



F-statistic: 6.822 on 5 and 6 DF, p-value: 0.01838

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	9037471217	4518735608	15.7053	0.004125
TWI(X1, X2)	1	108070998	108070998	0.3756	0.562456
PQ(X1, X2)	2	669046754	334523377	1.1627	0.374325
Residuals	6	1726323081	287720514		
Lack of fit	3	417394369	139131456	0.3189	0.813510
Pure error	3	1308928712	436309571		

Stationary point of response surface:

X1	X2
8.378414	-4.156417

Stationary point in original units:

FR	Temp
2.675683	5.061499

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 1072.372 -7985.785

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.9536700	0.3008546
x2	0.3008546	0.9536700



APIGENIN

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ FO(X1, X2) + TWI(X1, X2), data = CR1)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	11375592	937496	12.1340	0.0002647	***
X1	3579970	1325820	2.7002	0.0540834	.
X2	-1098612	1325820	-0.8286	0.4538945	
X1:X2	969968	1325820	0.7316	0.5049666	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.6803, Adjusted R-squared: 0.4406
F-statistic: 2.838 on 3 and 4 DF, p-value: 0.1698

Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	5.6093e+13	2.8046e+13	3.9888	0.11153
TWI(X1, X2)	1	3.7634e+12	3.7634e+12	0.5352	0.50497
Residuals	4	2.8125e+13	7.0312e+12		
Lack of fit	1	2.4146e+13	2.4146e+13	18.2046	0.02362
Pure error	3	3.9790e+12	1.3263e+12		

Stationary point of response surface:

X1	X2
1.132627	-3.690812

Stationary point in original units:

FR	Temp
1.226525	7.855130

Eigenanalysis:

```
eigen() decomposition
$values
[1] 484984.1 -484984.1
```

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	0.7071068	-0.7071068
x2	0.7071068	0.7071068

> summary(CR.rsm)

Call:

```
rsm(formula = Eff ~ SO(X1, X2), data = CR)
```

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	9949106	780161	12.7526	1.427e-05	***
X1	3331772	514685	6.4734	0.0006452	***
X2	-262097	514685	-0.5092	0.6287657	
X1:X2	969968	804787	1.2052	0.2734805	
X1^2	1405016	474734	2.9596	0.0252966	*
X2^2	749499	474734	1.5788	0.1654656	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.8981, Adjusted R-squared: 0.8131
F-statistic: 10.57 on 5 and 6 DF, p-value: 0.006173



Analysis of Variance Table

Response: Eff

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FO(X1, X2)	2	1.0924e+14	5.4618e+13	21.0822	0.001933
TWI(X1, X2)	1	3.7634e+12	3.7634e+12	1.4526	0.273481
PQ(X1, X2)	2	2.3927e+13	1.1964e+13	4.6178	0.061076
Residuals	6	1.5544e+13	2.5907e+12		
Lack of fit	3	1.1565e+13	3.8551e+12	2.9066	0.202121
Pure error	3	3.9790e+12	1.3263e+12		

Stationary point of response surface:

x1	x2
-1.604376	1.213004

Stationary point in original units:

FR	Temp
0.6791248	37.2780260

Eigenanalysis:

eigen() decomposition

\$values

[1] 1662608 491907

\$vectors

	[,1]	[,2]
x1	-0.8831578	0.4690761
x2	-0.4690761	-0.8831578



ANEXO 3. TEST DE DESEABILIDAD. LÍMITES R Y PUNTOS R PARA TEST DE DESEABILIDAD

Se trabajaron con las eficiencias mínimas y máximas (límites S) presentadas en la siguiente tabla:

Límites R para el test de deseabilidad

Estándar	Eficiencia mínima	Eficiencia máxima
Mangiferina	213123.69	335860.91
Rutina	549888.01	1081620.03
Ácido gálico	11339.06	31931.72
Epicatequina	154909.91	509296.93
Ácido clorogénico	79457.13	160475.20
Ácido ferúlico	405404.82	479926.60
Apigenina	8270091.82	18683157.29

Y mediante la ponderación de los estándares se obtuvo los puntos R de un intervalo de 1 a 5

Puntos R de estándares para test de deseabilidad

Estándar	Puntuación dificultad	Puntuación expectativa	Puntuación total	R
Mangiferina	1	3	4	5
Rutina	2	2	4	4
Ácido gálico	2	1	3	3
Epicatequina	1	2	3	3
Ácido clorogénico	0	2	2	2
Ácido ferúlico	2	0	2	2
Apigenina	0	1	1	1

Se observa que a pesar de tener una puntuación total de 4 la mangiferina posee un R de 5; esto se debe a que por ser un compuesto propio de la matriz a analizar (mango), se agregó un punto adicional.

**ANEXO 4. TEST DE DESEABILIDAD (SOFTWARE R)**

```
> #Functions
> library("desirability")
> Mang<-function(x) 308496.0-60246.6*x[1]-28577.3*x[2]-10241.8*x[1]*x[
2]+6598.4*x[1]^2+12485.5*x[2]^2
> Rut<-function(x) 828369-10421*x[1]+158854*x[2]+121463*x[1]*x[2]
> Gal<-function(x) 24221.5-6595.6*x[1]-2254.2*x[2]+6430.1*x[1]*x[2]
> Epi<-function(x) 331401-131417*x[1]-94955*x[2]+112631*x[1]*x[2]
> Chl<-function(x) 142687.0-29438.0*x[1]-28277.0*x[2]-17603.7*x[1]*x[2
]+7304.5*x[1]^2+3779.0*x[2]^2
> Fer<-function(x) 459575.86-25835.35*x[1]-16019.10*x[2]-5197.86*x[1]*
x[2]+252.49*x[1]^2-7165.90*x[2]^2
> Api<-function(x) 9949106+3331772*x[1]-262097*x[2]+969968*x[1]*x[2]+1
405016*x[1]^2+749499*x[2]^2
>
> MangD<-dMax(213123.69, 335860.91)
> RutD<-dMax(549888.01, 1081620.03)
> GalD<-dMax(11339.06, 31931.72)
> EpiD<-dMax(154909.91, 509296.93)
> ChlD<-dMax(79457.13, 160475.20)
> FerD<-dMax(405404.82, 479926.60)
> ApiD<-dMax(8270091.82, 18683157.29)
> predOutcomes<-c(Mang(c(0,0)), Rut(c(0,0)), Gal(c(0,0)), Epi(c(0,0)), chl
(c(0,0)), Fer(c(0,0)), Api(c(0,0)))
> predOutcomes
[1] 308496.0 828369.0 24221.5 331401.0 142687.0 459575.9 994910
6.0
> overalld<-doverall(MangD, RutD, GalD, EpiD, ChlD, FerD, ApiD)
> overalld
Combined desirability function

Call: doveralld.default(MangD, RutD, GalD, EpiD, ChlD, FerD, ApiD)

----
Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 213123.69, high = 335860.91)

Non-informative value: 0.5
----
Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 549888.01, high = 1081620.03)

Non-informative value: 0.5
----
Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 11339.06, high = 31931.72)

Non-informative value: 0.5
----
Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 154909.91, high = 509296.93)

Non-informative value: 0.5
----
Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 79457.13, high = 160475.2)

Non-informative value: 0.5
----
Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 405404.82, high = 479926.6)
```



Non-informative value: 0.5

Larger-is-better desirability function

Call: dMax.default(low = 8270091.82, high = 18683157.29)

Non-informative value: 0.5

```
>
> #FUNCTION rsmOpt
> rsmOpt<-function (x,dObject,space="square")
+ {
+   MangOp<-Mang(x)
+   RutOp<-Rut(x)
+   GalOp<-Gal(x)
+   EpiOp<-Epi(x)
+   ChlOp<-Chl(x)
+   FerOp<-Fer(x)
+   ApiOp<-Api(x)
+
+   out<-predict(dObject,data.frame(MangOp=MangOp,RutOp=RutOp,GalOp=GalOp,EpiOp=EpiOp,ChlOp=ChlOp,FerOp=FerOp,ApiOp=ApiOp))
+
+   if (space=="circular")
+   {
+     if (sqrt(sum(x^2))>1.414) out<-0
+   }else if (space=="square") if (any(abs(x)>1.414)) out<-0
+
+   out
+ }
>
>
> #Search Grid
> searchGrid<-expand.grid(FR=seq(-1.3,1.3,length=2),Temp=seq(-1.3,1.3,length=5))
> for(i in 1:dim(searchGrid)[1])
+ {
+   tmp<-optim(as.vector(searchGrid[i,]),rsmOpt,dObject=overallD,space="circular",control=list(fnscale=-1))
+
+   if (i==1)
+   {
+     best<-tmp
+   }else {
+     if(tmp$value>best$value) best<-tmp
+   }
+ }
> best
$`par`
      FR      Temp
-0.812906 -1.156970

$value
[1] 0.7009656

$counts
function gradient
      269      NA

$convergence
[1] 0

$message
NULL
```