

Optimización de un método de extracción para fenoles y flavonoides totales en pulpa de mango (*Mangifera indica* L.) asistida por ultrasonido

Optimization of an extraction method for phenols and total flavonoids in mango pulp (*Mangifera indica* L.) ultrasound-assisted

S. Méndez¹, G. Ettiene¹, J. Raga² y E. Pérez-Pérez³

¹Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Ciudad Universitaria. Núcleo Agropecuario, Av. Goajira. Maracaibo. Estado Zulia. ZU 4005. Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Av. Goajira. Núcleo Técnico. Maracaibo, Zu 4002A Venezuela. ³Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola (CESID Frutícola-Apícola-Corpozulia). Km 27 de la vía hacia San Rafael de El Mojan, Mara, Zu 4044.

Resumen

El mango posee gran poder antioxidante, dado que contiene sustancias como carotenoides, vitaminas, fenoles y flavonoides, por lo que resulta conveniente, contar con un método eficiente para la extracción de este tipo de sustancias. Para lo cual se optimizó un método basado en la extracción ultrasónica empleando diferentes solventes, logrando mayor eficiencia con 1g de pulpa de mango, realizando extracciones sucesivas con agua:metanol:HCl (20:80% v/v a pH:2), acetona:etanol (60:40 % v/v) y acetato de etilo, determinando concentraciones de 453,6 mg Ac. Gálico y 6,1 mg CAT·100g⁻¹ pulpa, con DER <3%, permitiendo la determinación a partir de la misma solución extractora para fenoles totales y flavonoides totales, respectivamente.

Palabras clave: extracción ultrasónica, fitoquímicos, *Mangifera indica* L.

Abstract

Mango has a high antioxidant power by the presence of substances such as carotenoids, vitamins, phenols and flavonoids, which is good to have an efficient method for extracting these substances. For this purpose, a method based on

extraction with ultrasound for phenols and total flavonoids in mango pulp was optimized by employing different solvent mixtures for assisted extraction ultrasound achieving greater efficiency with 1 g of mango pulp, performing successive extractions with water : methanol: HCL (20:80% v / v pH: 2), acetone: ethanol (60:40% v / v) and ethyl acetate, to which, there was obtained 453.6 mg concentrations Gallic Acid and 6.1 mg Cat.100g⁻¹ pulp with DER <3%, allowing for the determination of total flavonoids and total phenols, to giving birth in the same solution for extraction, respectively.

Key words: ultrasound extraction, phytochemicals, *Mangifera indica* L.

Introducción

Los frutos de origen tropical poseen un gran poder antioxidante inherentes a su composición, dicho poder antioxidante se debe a la presencia de moléculas y macromoléculas con la capacidad de retardar o prevenir el intercambio electrónico, disminuyendo así el estrés oxidativo, estas moléculas corresponden a aquellas encontradas en sustancias como carotenoides, vitamina A, C y E, así como, los fenoles y flavonoides (Rincón *et al.*, 2008). El Mango (*Mangifera indica* L.) uno de los frutos tropicales más abundantes, ejerce una función anticancerígena otorgada por su riqueza en ácidos como: málico, palmítico, p-cumárico y mirístico, vitamina C y, especialmente, por su alto contenido en vitamina A, el mango constituye una buena fuente de compuestos antioxidantes, capaz de neutralizar los radicales libres y dotar al organismo de un poder defensivo en contra de la degradación de las células. Dadas las propiedades fitoquímicas propias de este fruto, es de suma importancia contar con un método analítico eficiente para la extracción de este tipo de sustancias. Estos compuestos pueden estar presentes en dos grandes categorías: solubles e insolubles: los solubles

Introduction

Tropical fruits have a great antioxidant power inherent to their composition, such antioxidant power is due to the presence of molecules and macro-molecules with the capacity of delaying or preventing the electronic interchange, reducing the oxidative stress, these molecules correspond to those found in substances such as carotenoids, vitamin A, C and E, as well as phenols and flavonoids (Rincón *et al.*, 2008).

Mango (*Mangifera indica* L.) one of the most abundant tropical fruits, has an anti-cancer function given by its richness in acids such as: mallic, palmitic, p-cumaric and miristic, vitamin C and, vitamin A, specially by its content of vitamin A; mango constitutes a good source of antioxidant components, able to neutralize the free radicals and provide the organism a defensive power against the degradation of the cells.

Given to the phyto-chemical properties of this fruit, it is very important to count to an efficient analytic method for the extraction of this type of substances. These compounds might be present in two big categories: soluble and insoluble: soluble are formed by free phenols (FP),

están conformados por los fenoles libres (FL), los fenoles glucosilados (FG) y los fenoles esterificados (FE) dentro de este grupo están los ácidos fenólicos, flavonoides y amidas fenólicas, cada subgrupo posee propiedades fisicoquímicas diferentes, como por ejemplo su solubilidad (Muhammad *et al.*, 2010), por lo que es necesario optimizar el proceso de extracción de los mismos evaluando diferentes medios de extracción para asegurar así su mayor y mejor extracción, para lo cual, se optimizó un método de extracción asistida por ultrasonido para la determinación de fenoles y flavonoides totales en pulpa de mango. El contenido de fenoles totales se determinó empleando el método de Folin-Ciocalteu y el contenido de flavonoides totales, a través, de un método colorimétrico con tricloruro de aluminio.

Material y métodos

Material vegetal

Se seleccionaron frutos de mango del banco de germoplasma del Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola (CESID Frutícola-Apícola-Corpozulia). Los frutos se lavaron con agua destilada y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0,1% v/v) por 5 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada, se eliminó el exocarpo y las semillas con ayuda de un cuchillo de acero inoxidable recubierto con cerámica. El mesocarpo fue homogeneizado en un procesador de alimentos (Oster).

Extracción

La extracción de los compuestos fenólicos se inició con un estudio de solubilidad asistida por ultrasonido

glycosyte phenols (GP) and esterified phenols (EP) among this group are the phenolic acids, flavonoids, phenols, each group has different physicochemical properties, for example, the solubility (Muhammad *et al.*, 2010); thus, it is necessary to optimize the extraction process evaluating the different extraction means to assure a better and best extraction; for this, an assisted extraction method by ultrasound was optimized for the determination of phenols and the total flavonoids in the pulp of mango.

The content of total phenol was determined employing the Folin-Ciocalteu method and the content of total flavonoids, using a colorimetric method with aluminum trichloride.

Materials and methods

Vegetal material

Mango fruits were selected from a germplasm bank of the Socialist Center of Fruit and Beekeeping Research and Development (CESID Fruit and Beekeeping-Corpozulia). The fruits washed with distilled water and disinfected with sodium hypochlorite (0.1% v/v) for 5 min. Later, were washed with distilled water, the exocarp and the seeds were eliminated using a stainless steel knife covered with ceramic. The mesocarp was homogenized in a food processor (Oster).

Extraction

The extraction of the phenolic compounds initiated with an ultrasound-assisted soluble study (35 KHz), for which, were added water, methanol, ethanol, acetone and ethyl acetate as solvents of interest. After

(35 KHz), para lo cual, se evaluaron agua, metanol, etanol, acetona y acetato de etilo como solventes de interés. A partir de los datos obtenidos se realizó la combinación de estos solventes para generar los sistemas de extracción a evaluar, una vez realizada la extracción se procedió a filtrar por gravedad a través de lana de vidrio. Los extractos y aguas de lavado se recolectaron en un balón volumétrico de 50 mL color ámbar para su posterior tratamiento.

Para la optimización del proceso de extracción se formaron las siguientes soluciones de extracción: solución de extracción A: metanol:agua (80:20%v/v) llevado a pH:2 con ácido clorhídrico, solución de extracción B: acetona:etanol (60:40%v/v) y solución de extracción C: acetato de etilo

Las soluciones (Sln) de extracción se evaluaron mediante un diseño de experimentos totalmente aleatorizado destacando así cuatro sistema de extracción, los cuales definiremos a continuación:

S-0: sistema comprendido por tres etapas de extracción consecutivas, etapa 1: 10 min de extracción con 20 mL de Sln Ext A, etapa 2: 10 min de extracción con 20 mL de Sln Ext B, etapa 3: 5 min de extracción con 10 mL Sln Ext. C.

S-1: sistema comprendido por dos etapas de extracción consecutivas, etapa 1: 10 min de extracción con 25 mL de Sln Ext A, etapa 2: 10 min de extracción con 25 mL de Sln Ext B.

S-2: sistema comprendido por dos etapas de extracción consecutivas, etapa 1: 10 min de extracción con 25 mL de Sln Ext B, etapa 2: 10 min de extracción con 25 mL de Sln Ext. C.

the data obtained, the combination of these solvents was done to generate the extraction systems to be evaluated, once performed the extraction it was preceded to filter by gravity using glass wool. The extracts and washing water were collected in a 50 mL amber volumetric balloon for its posterior treatment.

For the optimization of the extraction process the following extraction solutions were formed: extraction solution A: metanol:water (80:20%v/v) taken to pH:2 with chlorhydric acid, extraction solution B: acetone:ethanol (60:40%v/v) and extraction solution C: ethyl acetate.

Extraction solutions (Sln) were evaluated with a completely randomized design highlighting four extraction systems, which are defined as:

S-0: system formed by three consecutive extraction phases, phase 1: 10 min of extraction with 20 mL of Sln Ext A, phase 2: 10 min of extraction with 20 mL of Sln Ext B, phase 3: 5 min of extraction with 10 mL Sln Ext. C.

S-1: system formed by two consecutive extraction phases, phase 1: 10 min of extraction with 25 mL of Sln Ext A, phase 2: 10 min of extraction with 25 mL of Sln Ext B.

S-2: system formed by two consecutive extraction phases, phase 1: 10 min of extraction with 25 mL of Sln Ext B, phase 2: 10 min of extraction with 25 mL of Sln Ext C.

S-3: system formed by two consecutive extraction phases, phase 1: 10 min of extraction with 25 mL of Sln Ext A, phase 2: 10 min of extraction with 25 mL of Sln Etx C.

S-3: sistema comprendido por dos etapas de extracción consecutivas, etapa 1: 10 min de extracción con 25 mL de Sln Ext A, etapa 2: 10 min de extracción con 25 mL de Sln Ext. C.

Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de fenoles totales, se baso en el método reportado por Kim *et al.*, (2003), con algunas modificaciones. Para ello, una alícuota del extracto se añadió a un tubo de ensayo que contenía un volumen medido de agua, seguidamente se añadió 0,5 mL del reactivo de Folin- Ciocalteu (1:1 con agua). Después de 5 min, 1,5 mL de carbonato de sodio (20% m/v), la mezcla se agitó y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente por 2 h, seguidamente, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 750 nm. (Peng-Min *et al.*, 2011). La concentración de polifenoles totales se determinó a través de comparación con una curva estándar de ácido gálico (0-50 mg.L⁻¹) preparada en la solución extractora. La curva se realizó siguiendo el mismo procedimiento de la muestra sustituyendo la muestra por 1 mL de cada estándar de ácido gálico (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 500 mg.L⁻¹). Para el blanco se sustituyó el estándar por la solución extractora.

Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó de acuerdo al método descrito por Zhishen *et al.*, (1999), con algunas modificaciones. Una alícuota del extracto se transfirió a un tubo de ensayo conteniendo un volumen agua. A tiempo cero, se agregó 0,15 mL de una solución de NaNO₂ (5% m/v). Des-

Content determination of total phenols

The determination of total phenols was based in the method reported by Kim *et al.*, (2003) with some modifications. For this, an aliquot of the extract was added to an assay tube which had a measured volume of water; later, was added 0.5mL of the reactive Folin-Ciocalteu (1:1 with water). After 5 min, 1.5mL of the sodium carbonate (20%*m/v*) was added to the mix and it was blended and stored in the dark at an environment temperature for 2H; later, the absorbance of the sample was measured at a wave longitude of 750 nm (Peng-Min *et al.*, 2011). The concentration of total polyphenols was determined though a comparison with a standard curve of gallic acid (0-50 mg.L⁻¹) prepared in the extracting solution. The curve was done following the same procedure of the sample, substituting the sample for 1 mL of each standard of gallic acid (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 500 mg.L⁻¹). For the white, the standard was substituted by the extracting solution).

Content determination of total flavonoids

The content of total flavonoids was determined according to the method described by Zhishen *et al.*, (1999) with some modifications. An aliquot of the extract was transferred to an assay tube with a volume of water. In zero time, 0.15 mL of the NaNO₂ (5% *m/v*) was added. After 5 min, 0.5 mL of AlCl₃ (10% *m/v*) were added. In min 6, was added 1 mL of NaOH 1M. After 5 min, 0.15 mL of AlCl₃ (10% *m/v*) was added. Within 6 min, 1 mL of NaOH 1M was added.

pués de 5 min., se añadió 0,15 mL de AlCl_3 (10% m/v). A los 6 min., se agregó 1 mL de NaOH 1M. Inmediatamente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm (Peng-Min *et al.*, 2011).

La concentración de los flavonoides totales en la muestra se calculó por comparación con una curva estándar de catequina ($0\text{-}25 \text{ mg.L}^{-1}$) preparada en solución extractora. La curva se realizó siguiendo el mismo procedimiento de la muestra sustituyendo la muestra por 1 mL de cada patrón de catequina (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 mg.L^{-1}). Para el blanco se sustituyó el estándar por la solución extractora.

Resultados y discusión

Del empleo de extracciones sucesivas asistidas con ultrasonido y distintos sistemas de extracción se obtuvieron diferentes contenidos de fenoles y flavonoides totales en pulpa de mango, la figura 1 muestra los resultados obtenidos para los sistemas en los cuales se obtuvo una mejor extracción.

Según el conjunto de datos obtenidos la extracción de la mayor cantidad de fenoles solubles totales se logró cuando se emplearon los tres sistemas de extracción por separado y continuos, lo que indica que la extracción secuencial de las diferentes soluciones extractoras, así como la variación de la polaridad y la presencia del acetato de etilo, potencia el poder de extracción de las sustancias en cuestión.

Es posible inferir que se evita el fenómeno de saturación del medio al emplear extracciones sucesivas y por separado, promoviendo así la

Immediately, the absorbance was measured at a wave longitude of 510 nm (Peng-Min *et al.*, 2011).

The concentration of total flavonoids in the sample was calculated by comparison with a standard catechin curve ($0\text{-}25 \text{ mg.L}^{-1}$) prepared in an extracting solution. The curve was done following the same sampling procedure substituting the sample by 1mL of each catechin pattern (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 mg.L^{-1}). For the white, the standard was substituted by the extracting solution.

Results and discussion

Different contents of phenols and total flavonoids were obtained in the pulp of mango, employing ultrasound-assisted successive extraction and different extraction systems, figure 1 shows the results obtained for the systems where was obtained a better extraction.

According to the data obtained, the extraction with the highest quantity of total soluble phenols was achieved when employing the three extractions systems by separate and continuous, which indicates that the sequential extraction of the different extracting solutions, as well as the variation of polarity and the presence of ethyl acetate, potentiates the extraction power of the substances.

It is possible to infer that the saturation phenomena of the media is avoided when employing successive and separate extractions; thus, promoting the solubility of the photo-chemicals. Also, it is observed that where the ethyl acetate acts, the extraction of the total photo-chemical increases significantly,

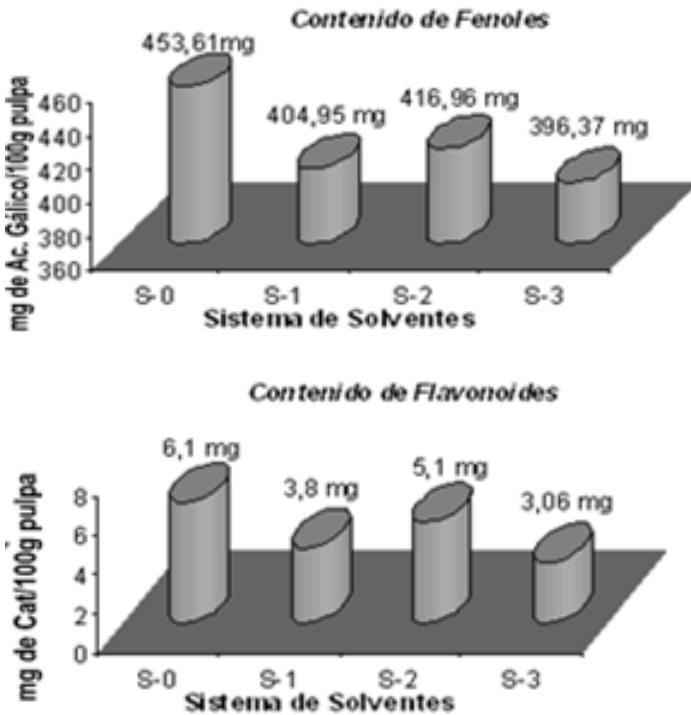


Figura 1. Contenido de fenoles y flavonoides totales en pulpa de mango a partir de los distintos sistemas de extracción empleados.

Figure 1. Content of phenols and total flavonoids in the mango pulp after different extraction systems employed.

solubilidad de los fotoquímicos. También se observa que donde interviene el acetato de etilo, la extracción de los fotoquímicos totales aumenta significativamente, lo cual puede atribuirse a las características propias del solvente, tales como, tamaño molecular y polaridad.

Al considerar la naturaleza polar de los compuestos fitoquímicos es factible comprender el empleo en una primera fase de extracción metanol: agua, dado que ambas sustancias poseen una constante dieléctrica elevada (33:82), posteriormente, en una se-

which might attribute to the own characteristics of the solvent, such as molecular size and polarity.

When considering the polar nature of the phyto-chemical compounds, it is easy to understand the employ in a first extraction phase methanol: water, due to both substances have a high dielectric constant (33:82); later, in a second extraction phase, acetone: ethanol was employed, with the aim of extracting the substances with similar polarity; finally, ethyl acetate, which thanks to its molecular size might penetrate the interstices of the

gunda etapa de extracción se empleó acetona: etanol, con la finalidad de extraer las sustancias de similar polaridad y finalmente, acetato de etilo, el cual gracias a su tamaño molecular puede penetrar los intersticios de la matriz logrando así un proceso de extracción eficiente. En este sentido, Cabrera *et al.* (2009), emplearon acetato de etilo en una extracción líquido-líquido para la extracción de fenoles libres.

Estratégicamente los procesos de extracción se realizaron por separado empleando un máximo de 10 minutos de extracción para maximizar el proceso de disolución de los compuestos fitoquímicos evitando así la saturación del medio, contabilizando tiempos de extracción no mayores a 25 minutos. Logrando así, una de las mejoras adicionales del proceso de optimización en este trabajo, dada la disminución de los tiempos de extracción en comparación con otros métodos. Por ejemplo el empleado por Patthamakanokporn y Puwastien, (2008), en el cual se emplearon más de tres horas de extracción y sucesivos eventos de centrifugación y filtración, haciendo largo y engorroso el proceso de extracción.

Conclusiones

El empleo de distintos sistemas de extracción aplicados en forma secuencial y asistida vía ultrasonido, permitió la optimización de un método para la extracción de fenoles y flavonoides totales en pulpa de mango. Logrando determinar contenidos de fenoles totales de 453,61 mg de Ac. Gálico.100g⁻¹ de pulpa y 6,1mg de

matrix, achieving an efficient extracting process. In this sense, Cabrera *et al.* (2009) employed ethyl acetate in a liquid-liquid extraction for the extraction of free phenols.

Strategically, the extracting processes were done by separate employing a maximum of 10 minutes of extraction to maximize the dissolution process of phyto-chemical compounds, avoiding the saturation of the media, counting the extraction times not higher to 25 min. Achieving one of the additional improvements of the optimization process in this research due to the reduction of the extraction times compared to other methods; for example the one employed by Patthamakanokporn and Puwastien, (2008), who employed more than three hours of extraction and successive centrifugation and filtering events, making the extraction method long and cumbersome.

Conclusions

The use of different extracting systems applied sequentially and ultrasound-assisted allowed the optimization of a method for the extraction of phenols and total flavonoids in the pulp of mango; thus, determining the contents of total phenols of 453.61 mg of Gallic acid.100g⁻¹ of pulp and 6.1mg of Cat.100g⁻¹ of the pulp, after a system compounded by methanol: water (80: 20% v/v, pH: 2), acetone: ethanol (60: 40% v/v), ethyl acetate, employing saturation times of 25 min and RSD lower to 3%.

End of english version

Cat. 100g¹ de pulpa, a partir de un sistema compuesto por metanol:agua (80:20 % v/v; pH:2), acetona:etanol (60:40 % v/v), acetato de etilo, empleando tiempos de extracción de 25 min, y DER menores al 3%.

Literatura citada

- Cabrera-Soto, M., S. Salinas-Moreno, G. Velázquez-Cardelas, E. Espinosa. 2009. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia* 43: 827-839.
- Kim, D., W. Seung, L. Chang. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81: 321-326.
- Muhammad, I., P. Nagendra, I. Amin, A. Azrina, H. Azizah. 2010. Physiochemical composition and antioxidant activities of underutilized *Mangifera pajang* fruit. *African Journal of Biotechnology*. 9(28): 4392-4397.
- Patthamakanokporn, O., P. Puwastien. 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 241-248.
- Peng-Min L., D. Guo-Rong y M. Feng-Wang. 2011. Phenolics concentration and antioxidant capacity of different fruit tissues of astringent versus non-astringent persimmons. *Scientia Horticulturae*. 129:710-714.
- Rincon A., E. Montilla, L. Valverde. 2008. Evaluación de dieciséis cultivares de mango (*Manguifera Indica* L.) en los llanos venezolanos. *Agricultura andina* 15:3-14
- Zhishen J., T. Mengcheng y W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*. 64:555-559.