



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**

CARRERA DE ALIMENTOS

**Determinación de composición química de extractos de
hojas de mango**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor: Villamagua Calva, Bryan David

Director: Meneses Chamba, Miguel Ángel

LOJA

2023



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2023

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 28 de febrero de 2023

Ingeniero en Alimentos

Mgtr. Jorge Felipe Reyes Bueno

Director de la Carrera de Alimentos

Ciudad. - Loja

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Determinación de composición química de extractos de hojas de mango realizado por Bryan David Villamagua Calva ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo se ha verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Dr. Miguel Ángel Meneses Chamba

C.I.: 1103885636

Correo electrónico: mameneses@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Bryan David Villamagua Calva, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: Determinación de composición química de extractos de hojas de mango, de la carrera de Ingeniería en Alimentos, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo Uno. Marco Teórico, Capítulo Dos. Materiales y Métodos, Capítulo Tres. Resultados y Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Dr. Miguel Ángel Meneses Chamba, director del presente trabajo; también declaró que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratificó que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación con la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Bryan David Villamagua Calva

C.I.:0706664968

Correo electrónico: bdvillamagua@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a Dios y a la Virgencita del Cisne, porque me han dado la vida y me han permitido realizar uno de mis objetivos propuestos, por brindarme las oportunidades para desarrollarme como ser humano, la valentía, fuerza, sabiduría y fortaleza para continuar día a día. Siendo quienes guían mi camino dándome en mi vida a personas maravillosas que son mi apoyo y compañía.

También dedico esta tesis a la persona más importante, a ti madre, con cariño, amor, gratitud y respeto, porque cada minuto me enseñas a triunfar, por tu apoyo incondicional, quien con tu ayuda, esfuerzo, fortaleza y sacrificio has luchado por formarme a ser una persona de bien y siempre hacer las cosas en el camino correcto con perseverancia. Así mismo por darme las herramientas adecuadas para alcanzar mis metas y por todo esto y mucho más, gracias mami.

Al Dr. Miguel Meneses, por guiar este trabajo, ya que sin su ayuda este gran sueño no sería posible. También a todos mis profesores que me inculcaron los más grandes conocimientos.

Agradecimiento

Agradezco a Dios y a la Virgen del Cisne, quienes me han guiado mi vida siempre por el bien y que con sus bendiciones me ha llenado de salud, fe, fortaleza, esperanza, amor, bondad y sabiduría para poder culminar esta etapa, cuando he caído me han puesto a prueba, comprendiendo mis errores y mejorando como ser humano.

Agradezco desde el fondo de mi corazón a mi familia, en especial a mi hermosa madre, María Calva, por creer y creer en mí.

A mis amigos quienes me brindaron la confianza y el apoyo para salir adelante.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por haber sido mi segundo hogar, y haber ayudado a reflejar mis valores; como una excelente persona y profesional; té agradezco porque en tus caminos, parques, biblioteca tuve grandes emociones y experiencias.

A cada docente que conforman la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que me aportaron su enseñanza y me ayudaron en la realización de este trabajo de titulación.

Quiero hacer un especial y honorífico agradecimiento a mi director de trabajo de titulación Dr. Miguel Ángel Meneses y al tutor Mgtr. Felipe Reyes, quienes siempre apostaron en mí y no dudaron en brindarme su apoyo, paciencia, confianza y tiempo. Gracias por compartir sus conocimientos y consejos conmigo para hacer bien este trabajo.

En fin, gracias a todas las personas que aportaron de forma positiva en mí durante estos años de duro sacrificio y esfuerzo en la carrera de Ingeniería en Alimentos.

Índice de contenido

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo Uno.....	5
Marco Teórico	5
1.1 Hoja de mango	5
1.2 Usos de las hojas de mango	6
1.3 Composición química.....	6
1.4 Taxonomía de las hojas de mango	7
1.5 Métodos de extracción	7
1.5.1 <i>Extracción sólido - líquido</i>	7
1.6 Tipos de extracción.....	8
1.6.1 <i>Maceración</i>	8
1.6.2 <i>Extracción asistida por ultrasonido</i>	8
1.6.3 <i>Extracción por líquido presurizado</i>	9
1.6.4 <i>Extracción supercrítica por co-solvente</i>	9

1.6	Factores que influyen en los procesos de extracción.....	10
1.7	Selección del solvente.....	10
1.8	Importancia y efectos terapéuticos de los metabolitos.....	10
1.9	Capacidad antioxidante	12
1.10	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	12
	Capítulo dos	14
	Materiales y Métodos.....	14
2.1	Reactivos y equipos.....	14
2.1.1	<i>Reactivos y solventes</i>	14
2.1.2	<i>Equipos utilizados</i>	14
2.2	Material	14
2.2.1	<i>Obtención de extractos</i>	14
2.3	Selección del método cromatográfico.....	16
2.3.1	<i>Preparación de las muestras</i>	16
2.3.2	<i>Preparación de los estándares</i>	16
2.3.3	<i>Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	17
2.3.4	<i>Análisis estadístico</i>	17
	Capítulo tres	18
	Resultados y Discusión.....	18
3.1	Resultado de la búsqueda bibliográfica del método para HPLC	19
3.2	Identificación de compuestos fenólicos.....	20
3.2.1	<i>Mangiferina</i>	21
3.2.2	<i>Quercetina</i>	23

3.2.3	Ácido Gálico	25
	Conclusiones	28
	Recomendaciones	29
	Referencias	30
	Apéndice	34
	Apéndice A. Tablas	34
	Apéndice B. Figuras	46
	Apéndice C. Nomenclatura	48

Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación Taxonómica del Mango	7
Tabla 2	Extractos estudiados	14
Tabla 3	Comparación de Métodos para HPLC	18
Tabla 4	Calibración de las curvas de los compuestos fenólicos	21
Tabla 5	Resultados de los compuestos químicos para las diferentes técnicas de extracción	21
Tabla 6	Pruebas de Múltiple Rangos para Mangiferina	22
Tabla 7	Pruebas de Múltiple Rangos para Quercetina	23
Tabla 8	Pruebas de Múltiple Rangos para Ácido Gálico	25

Índice de figuras

Figura 1	Hojas de Mango	5
Figura 2	Estructura de la Mangiferina	7
Figura 3	Estructura molecular base de los flavonoides	12
Figura 4	Equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Ultimate 3000	13
Figura 5	Gradiente de fase móvil	20

Figura 6 <i>Mangiferina Medias y 95.0% de Fisher LSD</i>	22
Figura 7 <i>Quercetina Medias y 95.0% de Fisher LSD</i>.....	24
Figura 8 <i>Ácido Gálico Medias y 95.0% de Fisher LSD</i>.....	26

Resumen

En el presente estudio se analizó la cantidad de componentes químicos como son la mangiferina, ácido gálico y quercetina, también conocidos como compuestos fenólicos. Los extractos de hojas de mango de la especie *Mangifera indica L.* se leyeron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) estos fueron extraídos por los métodos de extracción siguiente; maceración, ultrasonido, líquido presurizado y co-solvente, para cada uno se utilizó etanol como solvente para realizar triplicado por cada extracción con un total de 12 extractos. El método que presento cromatogramas más cercanos a los encontrados en bibliografía y los obtenidos de forma experimental fue el siguiente: consistió en la mezcla agua/0,1 % de ácido fórmico como (disolvente A) y la mezcla de acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % como (disolvente B). La concentración de mangiferina en el presente estudio con mayor cantidad fue 441,14 mg/g extraído por maceración, mientras que ácido gálico de 13,82 mg/g por ultrasonido y quercetina 7,49 mg/g mediante la extracción por ultrasonido.

Palabras clave: HPLC, compuestos fenólicos, hojas de mango.

Abstract

In the present study, the amount of chemical components such as mangiferin, gallic acid and quercetin, also known as phenolic compounds, was analyzed. The extracts of mango leaves of the species *Mangifera indica* L. were read by high performance liquid chromatography (HPLC) and extracted by the following extraction methods: maceration, ultrasound, pressurized liquid and co-solvent, for each one ethanol was used as solvent to perform triplicates for each extraction with a total of twelve extracts. The method that presented chromatograms closest to those found in the literature and those obtained experimentally was the following: it consisted of the mixture water/0.1 % formic acid as solvent A and the mixture acetonitrile/formic acid at 0.1 % as solvent B. The concentration of mangiferin in the extracts was determined by the following method: the concentration of mangiferin in the solvent was determined by the mixture water/0.1 % formic acid (solvent B). The concentration of mangiferin in the present study with the highest amount was 441,14 mg/g extracted by maceration, while gallic acid of 13,82 mg/g by ultrasonic extraction and quercetin of 7,49 mg/g by ultrasonic.

Key words: HPLC, phenolic compounds, mango leaves.

Introducción

Se ha demostrado que las hojas, la corteza, la cáscara, las semillas y la fruta del mango contienen antioxidantes que se puede utilizar para conservar los alimentos, prevenir enfermedades crónicas, cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, diabetes, osteoporosis e incluso tratar la artritis, hipertensión y reumatismo.

La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja, ha venido trabajando con las hojas de mango, donde sus trabajos se han encaminado a solucionar problemas que se tiene en una amplia gama de industrias alimentarias debido a la oxidación de diferentes productos alimenticios donde se lo puede evitar o retrasar sustituyendo antioxidantes sintéticos por naturales, presentes de las mismas hojas la cual satisfaga a la sociedad en productos innovadores.

Así como este trabajo pretende analizar el mejor método de extracción de antioxidantes de las hojas de mango para usarlos y generar un valor agregado al producto final que se cree mediante su incorporación, servirá de aporte de la investigación realizada en los campos de la Ingeniería en Alimentos.

En el alcance de los objetivos se logró determinar la composición química de los extractos de mango mediante método cromatográfico para determinar la relación entre los métodos de extracción y la composición química.

Las facilidades u oportunidades fueron que ya se contaba con algunas muestras de los extractos por los diferentes métodos de extracción, así mismo la materia prima como son las hojas de mango ya procesadas, por otra parte, los laboratorios del Departamento de Química cuentan con los equipos y materiales necesarios para realizar las extracciones que faltaba de dichos métodos.

La metodología utilizada para la presente investigación fue primeramente realizar diferentes extracciones para obtener los extractos de hojas de mango como son extracción por maceración, por ultrasonido, extracción supercrítica co-solvente y extracción por líquido presurizado. Luego ya obtenidos los extractos se procedió analizar y seleccionar el método

cromatográfico que permita la mayor elucidación de los componentes químicos y que presente los cromatogramas más cercanos a aquellos tomados como referencia.

En el capítulo uno se presenta el marco teórico donde se exponen bases teóricas y el estado del arte de las hojas de mango, procesos de extracción, métodos cromatográficos por HPLC y los antioxidantes. Para el capítulo 2 se presenta la metodología usada para el proceso de extracción de las hojas de mango y los métodos aplicados en la determinación de compuestos fenólicos por HPLC. En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos de esta investigación y su discusión. Además, se presenta la sección de conclusiones y recomendación, así como la bibliografía utilizada en esta investigación.

Capítulo Uno

Marco Teórico

1.1 Hoja de mango

El mango (*Mangifera indica* L.) es conocido como una fruta tropical con un sabor característico, color y alto contenido de nutrientes. El mango posee una exquisita composición debido a su contenido de compuestos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico, minerales, fibras, azúcar y otros compuestos orgánicos (Maldonado et al., 2016). La producción mundial de mangos se concentra especialmente en Asia y más esencialmente en la India, que produce 15 millones de toneladas promedio al año (Mitra, 2016). Las hojas del árbol, que aparecen en la Figura 1, miden aproximadamente de 15 a 25 centímetros de largo. Se alternan en el árbol y se extienden desde el centro. Son subcoriáceos y en forma de corazón con pecíolos enteros. Este árbol crece hasta 20 metros de altura y 2,5 metros de diámetro en el tronco. Tiene pequeñas flores agrupadas en grandes racimos terminales con cuatro o cinco pétalos superpuestos. Su fruto drupáceo, monospermo, tamaño y coloración distinta según el cultivo, pulpa suave, jugosa y su semilla de forma aplanada (Corrales et al., 2014).

Figura 1

Hojas de Mango



Nota. Tomado de hojas de mango [Fotografía], por M.P.N. texan, 2009, Flickr (<https://bit.ly/3QUWMfT>).

CC BY 2.0.

Data Bridge Market Research de Brasil publicó recientemente un informe sobre el desempeño de los mangos en el mercado del país, donde los resultados mostraron que el consumo mundial de mango había aumentado significativamente en los últimos años. Se espera que este revés financiero temporal para la industria brasileña del mango dure al menos hasta 2029. El aumento de ingresos anual promedio es un crecimiento sustancial de las ganancias del 5 % anual. Las empresas de Asia-Pacífico son las más comunes para las grandes empresas debido a la gran población de la región (Malheiros, 2023).

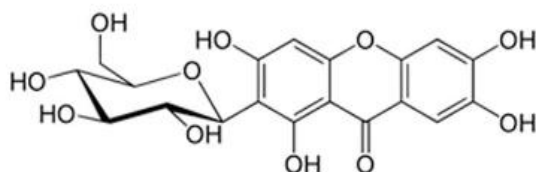
La temporada de mango en Ecuador es de octubre hasta diciembre. En el suroeste de Ecuador se produce la mayor parte de los mangos, específicamente en la provincia de Guayas. México y Europa son mercados importantes para las exportaciones anuales de mango. El área total de producción de mango del país es de aproximadamente 7.700 hectáreas; 5.500 de estas son para exportación. Alrededor del 90 % de estas exportaciones van a los EE. UU, Canadá y otros países toman alrededor de 2.500 contenedores cada año. Ecuador produce más del 50 % de los mangos Tommy Atkins. Algunas variedades populares que produce Ecuador son Ataúlfo, Kent y Keitt (Montoya, 2021).

1.2 Usos de las hojas de mango

La actividad antimicrobiana de las hojas de mango es apreciada como potencial útil para la conservación industrial de alimentos o en usos farmacéuticos, atribuyendo esta actividad a los compuestos fenólicos o terpenos que los mismos contienen (Torres et al., 2017).

1.3 Composición química

En las hojas de mango podemos encontrar esteroides, flavonoides (mangiferina, quercetina, etc.) (Figura 2), glucósidos cardiotónicos, azúcares reductores, polifenoles, antraquinona, taninos gálicos y saponinas (Triana, 2016).

Figura 2*Estructura de la Mangiferina*

Nota. Adaptado de Fomenko & Chi (2016).

1.4 Taxonomía de las hojas de mango

A continuación, en la Tabla 1, se muestra la clasificación taxonómica del mango

Tabla 1*Clasificación Taxonómica del Mango*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Mangifera</i>
Especie	M.indica

Nota. Masud Parvez (2016, p. 2).

1.5 Métodos de extracción

La extracción es uno de los métodos utilizados para separar una sustancia orgánica de una mezcla de reacción o para aislarla de las sustancias originales. Se define como el componente separador de una mezcla con un solvente (Martínez, 2016).

1.5.1 Extracción sólido - líquido

La extracción sólido-líquido es la operación que separa uno o varios componentes solubles incluidos en un sólido inerte usando un disolvente apropiado (Triana, 2016).

Los métodos convencionales (clásicos) son fáciles de realizar, no necesitan equipos especiales como son la maceración, reflujo y extracción Soxhlet, pero ya no se usan hoy en día, se utilizan ahora técnicas prometedoras y nuevas que se denominan “verdes” porque

tienen muchas ventajas, como la prevención de la contaminación, la eliminación de pasos adicionales de limpieza y concentración de muestras, reduce el consumo de disolventes orgánicos y degradación de la muestra, aumenta la eficiencia y selectividad de la extracción. Como ejemplo se pueden mencionar las técnicas de extracción asistida por enzimas, ultrasonido, microondas, extracción de fluido supercrítico y extracción de líquido presurizado (Gioffre, 2020).

1.6 Tipos de extracción

1.6.1 *Maceración.*

La maceración se ha utilizado durante mucho tiempo como método de extracción sólido-líquido. Se realiza dentro de un cierto período de tiempo poniendo en contacto las plantas con un solvente seleccionado por polaridad bajo ciertas condiciones. Esta tecnología se puede aplicar a baja o alta temperatura dependiendo de las materias primas y los requisitos. Además, se puede agregar agitación para mejorar la solubilidad del compuesto y mejorar la eficiencia del proceso. Finalmente, el extracto obtenido se evapora para concentrar los compuestos y eliminar el disolvente. Para este método de extracción se necesita agitadores para realizar la agitación magnética a temperaturas entre 20 °C a 60 °C con 150 a 200 rpm, rotaevaporadores con temperaturas de 30 °C a 40 °C, donde el tiempo de maceración por lo general va entre 3 a 24 horas (Vilca, 2019).

En la maceración se extrae el soluto en fase sólida al entrar en contacto íntimo con un disolvente soluble. La maceración también significa la extracción de diversos compuestos de interés por ósmosis y difusión a partir de una matriz sólida (en este caso hojas) por contacto con etanol (Coto, 2014).

1.6.2 *Extracción asistida por ultrasonido*

El proceso de extracción ultrasónica acorta significativamente los tiempos de extracción, evita la degradación térmica de los componentes termolábiles, reduce el consumo de solventes, reduce la contaminación ambiental, proporciona altos rendimientos y reduce los costos operativos (Acosta et al., 2016).

El ultrasonido provoca la ruptura mecánica de las paredes celulares, lo que libera componentes bioactivos, y el calentamiento localizado del solvente aumenta la difusión del extracto y mejora la transferencia de masa mediante la interfase de sólido a líquido. Para realizar la extracción se usan generadores de ondas de ultrasonido con rangos de frecuencia entre 40 a 42 kHz, una potencia de 160 a 200 W y temperaturas por lo general entre 30 a 60 °C (Rojas et al., 2019).

1.6.3 Extracción por líquido presurizado

El método de extracción de líquidos a presión es una de las tecnologías tradicionales, ya que aumenta el rendimiento y la selectividad del proceso, con tiempos de extracción cortos y es muy amigable con el medioambiente. Este método utiliza disolventes líquidos a temperaturas y presiones por debajo del punto crítico, de modo que incluso cuando la temperatura está por encima del punto de ebullición, el disolvente permanece líquido debido a la alta presión. Por lo tanto, al mejorar la solubilidad y facilitar la transferencia de masa, se mejora el rendimiento de extracción. Para llevar a cabo dicha extracción se usan equipos de extracción de alta presión con parámetros importantes como son las presiones que van desde 100 a 200 bares, temperaturas de 60 a 100 °C, tiempo de extracción de 2 a 4 horas y la utilización de disolventes como agua, etanol, metanol, acetona y hexano (Figuerola, 2018).

1.6.4 Extracción supercrítica por co-solvente

Actualmente, se busca el desarrollo de tecnologías que sean más amigables con el medioambiente, más eficientes y que permitan obtener productos de alta pureza y calidad. Una de estas tecnologías es la extracción supercrítica, que, en propiedades solventes, permite procesos más rápidos y eficientes, así como el uso de solventes verdes como el dióxido de carbono supercrítico (Sánchez et al., 2017). La presión aumenta más allá de la presión crítica de la sustancia utilizada como disolvente. La temperatura se eleva o se reduce por medios físicos o mecánicos para llevar el disolvente a la temperatura de extracción adecuada. Ahora la muestra que lleva el soluto de estudio entra en contacto en el extractor con el fluido supercrítico. Donde el solvente se descomprime por debajo de la presión crítica y se libera el soluto. Para ello se opera a condiciones de presión (100-200 bares), temperatura

(60-100 °C), con un caudal (2-50 L/min) tanto para el CO₂ como para el disolvente (etanol, agua) y en un tiempo de extracción de 2 a 4 horas (Román et al., 2016).

1.6 Factores que influyen en los procesos de extracción

La selección del solvente óptimo que logre extraer el mayor rendimiento del compuesto de interés. El tamaño de las partículas de los sólidos también es un factor importante, ya que a menor tamaño son las partículas, mayor será la superficie de contacto entre el vegetal y el solvente. Los disolventes deben ser lo más selectivos posible, preferiblemente de baja viscosidad. La naturaleza del solvente podrá ser agua, disolventes orgánicos, mezclas hidroalcohólicas o propilenglicol. La temperatura es un factor crítico en la preparación de los extractos, ya que las elevadas favorecen la extracción, pero se debe tener especial cuidado si la sustancia no es resistente al calor y las altas temperaturas. El tiempo de extracción y la velocidad de agitación son los parámetros que determinan el rendimiento del producto a extraer. Si tenemos más tiempo de exposición, mejor será la capacidad del disolvente para alcanzar la concentración de equilibrio. La agitación del disolvente-soluto facilita el transporte al aumentar el coeficiente de transferencia de masa en la interfase sólido - líquido. Evitando la sedimentación y aglomeración de partículas sólidas (Triana, 2016).

1.7 Selección del solvente

Se debe elegir un solvente útil de tal forma que brinde el excelente balance de algunas características deseables: como baja viscosidad, selectividad y alto límite de saturación en relación con el soluto por extraer, baja presión de vapor, bajo costo, permanencia química en las situaciones que conlleva el proceso, baja densidad, la capacidad de producir extractos con eficacia no afectada por el disolvente, baja tensión superficial, baja toxicidad e inflamabilidad. Cada disolvente crea mezclas únicas gracias a sus diferentes propiedades (Rangel & Orozco, 2014).

Las preocupaciones ambientales, de salud y de seguridad han aumentado el uso de solventes alternativos como isopropanol, etanol, hidrocarburos e incluso agua (Rodríguez, 2019).

1.8 Importancia y efectos terapéuticos de los metabolitos

Los metabolitos secundarios derivados de plantas contribuyen a su desarrollo normal y son responsables de los efectos terapéuticos utilizados en una amplia gama de patologías asociadas con el daño de los radicales libres, incluido el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes, la disfunción cardiovascular, las enfermedades inmunitarias y la senescencia. Por lo tanto, el interés en estos compuestos ha dado lugar a efectos biológicos beneficiosos tales como: propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas, antidiabéticas, etc (Martínez et al., 2014).

Los principales constituyentes químicos o metabolitos secundarios fueron identificados por investigación fitoquímica; taninos, alcaloides, saponinas, cumarinas, flavonoides, quinonas, polifenoles, esteroides, azúcares reductores, glucósidos cardíacos y antraquinonas (Triana, 2016).

Polifenoles

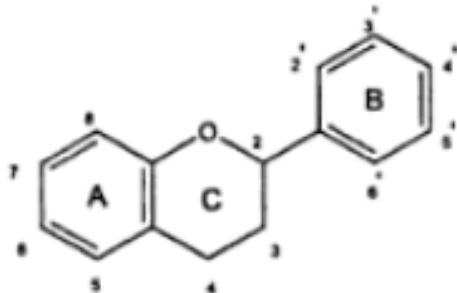
En la naturaleza hay muchos compuestos diferentes con una estructura molecular caracterizada por anillos fenólicos. Se derivan de las plantas y se sintetizan en gran cantidad como productos del metabolismo secundario. Algunos de ellos son necesarios para la fisiología vegetal. Otros están implicados en funciones protectoras frente a situaciones estresantes y diversos estímulos (luz, agua, etc.). Según los elementos estructurales y el número de anillos fenólicos presentes en estos anillos, los polifenoles se pueden dividir en varias clases y subclases. Las principales clases de polifenoles son: estilbenos, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, lignanos y flavonoides (Quiñones et al., 2012).

Flavonoides

Los flavonoides (Figura 3) forman la subclase de polifenoles más mayoritaria en el reino vegetal. Dotan a las plantas de rasgos fenotípicos atractivos para la polinización, como sabor a frutas, color de flores, aroma, protección y resistencia contra plagas, enfermedades y radiaciones. Unos polifenoles son exclusivos de ciertos alimentos (isoflavonas en soja, flavanonas en cítricos). Otras sustancias como la quercetina se logran encontrar en muchas plantas (vegetales, frutas, cereales, té, leguminosas, vino, etc.) (Quiñones et al., 2012).

Figura 3

Estructura molecular base de los flavonoides



Nota. Adaptado de Carrión & García (2010).

1.9 Capacidad antioxidante

Las características fundamentales de cualquier prueba de evaluación de la capacidad antioxidante son un sustrato apropiado para vigilar la inhibición de la oxidación, un iniciador de la oxidación (radical libre) y una correcta medida del punto final de la oxidación, que logra realizarse mediante métodos químicos, instrumentales o sensoriales (Zambrano & García, 2016). Se define como la capacidad de un compuesto o sustancia de evitar la oxidación de un sustrato incluso en cantidades muy pequeñas (<1 %, típicamente 1–1000 mg/L). Sus mediciones se pueden utilizar para evaluar la calidad de los alimentos, la biodisponibilidad en humanos de compuestos antioxidantes o los niveles de antioxidantes en un sistema (Benítez et al., 2020).

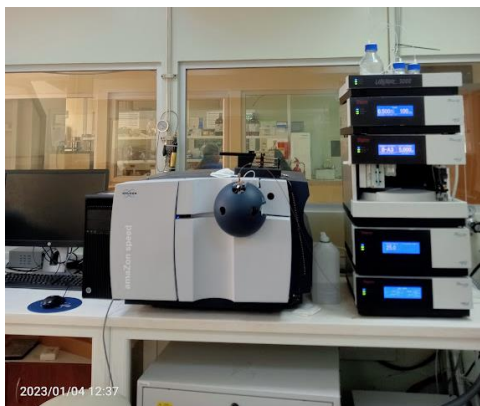
1.10 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC) permite separar los compuestos de pesos moleculares de 54 a 450.000 Daltons, el cual se puede utilizar este equipo para compuestos estables térmicamente o volátiles (Jara, 2014).

Dentro de los componentes del equipo de HPLC se encuentran: fase móvil, bomba, inyector, columna, detector y software de registro (Figura 4). Los diferentes estudios en el equipo cromatográfico pueden ejecutarse en unos cortos minutos, la muestra a determinar pasa a través de una fase estacionaria empaquetada en columnas de acero inoxidable por las que circula la fase móvil con una determinada presión y flujo (Agostina et al., 2016).

Figura 4

*Equipo de HPLC (High Performance
Liquid Chromatography) Ultimate 3000*



Capítulo dos

Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y equipos.

2.1.1 Reactivos y solventes

Los Reactivos empleados para la extracción fueron de grado analítico HPLC: Quercetina de marca Sigma con una pureza de 95 %, Ácido Gálico de la marca Sigma con una pureza de ≥ 95 %, Mangiferina de la marca Sigma con una pureza de ≥ 98 %.

Los solventes utilizados fueron: Etanol absoluto de la marca Scharlab S.L. a 99.5 % de pureza, Agua destilada, Ácido fórmico de la marca Fluka Analytical al 98 % de pureza, Acetonitrilo de la marca Fisher Scientific grado HPLC al 99.9 % de pureza.

2.1.2 Equipos utilizados

- Balanza analítica Mettler Toledo AC100
- Agitador Vórtex Mixer Labnet international, Inc.
- Estufa de convección forzada Memmert
- HPLC (Dionex Ultimate 3000 Autosampler)
- Ultrasonic Cleaner (FS20 Fisher Scientific)
- Centrífuga de sobremesa pequeña Sorvall™ ST 8 ThermoFisher Scientific
- Rotavapor Buchi R-200 con baño calefactor B-490, bomba aspiradora V-100
- Tamizador Vibratorio konti J. Engelsmann AG
- Liofilizador Labconco 7754047

2.2 Material

2.2.1 Obtención de extractos

Las muestras disponibles para este estudio se obtuvieron previamente en otros proyectos ver Tabla 2. Los análisis se realizaron por triplicado para cada extracción.

Tabla 2

Extractos estudiados

Muestras de Extracciones de hojas de Mango			
Líquido Presurizado	Ultrasonido	Co-solvente	Maceración

Nota. Muestras analizadas en el presente trabajo. N°=3 repeticiones por cada extracción

Maceración

Aproximadamente 25 g de muestra se sometieron a maceración con 500 ml de etanol al 99.5 % en baño maría a una temperatura de 45 °C con agitación magnética de 160 rpm durante un lapso de 6 horas. Transcurrido este tiempo se filtró al vacío, la solución líquida se evaporó en un rotavapor BUCHI Rv-B2 a 35 °C para obtener el extracto y almacenarlo en refrigeración (Torres et al., 2017).

Ultrasonido

Se pesó 1 g de muestra en un tubo de centrifuga, se mezcló con 20 ml de etanol, luego se procedió a sumergir en el equipo Ultrasonic Cleaner (FS20 Fisher Scientific) con una potencia de 100 W, frecuencia de 42 kHz, en un tiempo de 30 min y a temperatura de 60 °C (Zou et al., 2014).

Líquido presurizado

Para este procedimiento se cargó un extractor con unos 30 g de muestra y se procedió a alimentar un flujo de etanol 99,5 %, se mantuvo el flujo de etanol hasta que la presión aumente a 120 bar a una temperatura de 60 °C, el flujo de solvente a la presión mencionada se mantuvo durante 3 horas, posteriormente se despresurizó el extractor. El extracto líquido se evaporó en un rotavapor BUCHI Rv-B2 a 35 °C para obtener el extracto y almacenarlo en refrigeración (Benítez, 2020).

Extracción supercrítica co-solvente

La metodología de extracción supercrítica con co-solvente se cargó el extractor con 30 g de muestra deshidratada y triturada. Se acondicionaron las variables de funcionamiento del equipo de extracción con fluidos supercríticos, temperatura 45 °C y presión 150 bar. El flujo de CO₂ en mezcla con etanol se realizó a través de la bomba de alta presión, asegurando que la mezcla de CO₂ (99.9 %)-Etanol (99.5 %) molar. La extracción se realizó durante 3 horas con un flujo de etanol a 2 ml/min y un flujo de CO₂ a 20 ml/min (condiciones ambientales). El extracto líquido obtenido se evaporó en un rotavapor BUCHI Rv-B2 a 35 °C para obtener el extracto y almacenarlo en refrigeración para su posterior análisis (Fernández & Casas, 2011).

2.3 Selección del método cromatográfico

Para elegir el método cromatográfico que permita la mayor elucidación de los componentes químicos y que presente los cromatogramas más cercanos a aquellos tomados como referencia, fue necesario realizar una búsqueda bibliográfica en bases de datos como:

- Scopus: <https://www.scopus.com/home.uri>
- ISI Web: <https://www.webofscience.com/wos/alldb/basic-search>
- PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ScienceDirect: <https://bit.ly/2BL9yu1>

Para ello, se utilizaron palabras claves, tales como: HPLC, Mango leaves, antioxidantes, mangiferina realizando filtros para mejorar la búsqueda de información como es el año:2012-2022, el área de investigación: Ingeniería Química, Alimentos.

2.3.1 Preparación de las muestras

Los extractos obtenidos se diluyeron con etanol grado HPLC 30 mg/10 ml, esto es, a una concentración de 3.000 ppm para identificar los compuestos. Posteriormente, se procede a resolver bien en el vórtex Labnet modelo VX 100 durante 5 minutos a 2000 rpm, pasar al baño ultrasonido para homogeneizar por 10 minutos, filtrar con un Filtro de jeringa de PTFE (hidrofóbico) Thermo Scientific™ Titan3™, 0,45 µm para trasvasar a un vial de HPLC para su posterior inyección y análisis correspondiente (Torres et al., 2017).

2.3.2 Preparación de los estándares

Para su preparación se hizo una solución de 1000 ppm el cual de dicha solución madre se hizo 5 distintas concentraciones (500-250-125-60-30) ppm, para ello se pesaron 10 mg de cada estándar y se añadieron 10 ml de metanol. Ahora para preparar la solución de 500 ppm se colocó 1 ml el cual se lo obtuvo con la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ en donde se despejó V_1 siendo $C_2(500 \text{ ppm})$, $V_2(2 \text{ ml})$, $C_1(1000 \text{ ppm})$ y se le completó con etanol para tener 2 ml en el vial de HPLC para su posterior inyección y análisis. Este procedimiento se hizo el mismo para las demás concentraciones.

2.3.3 *Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

Una vez seleccionado el método cromatográfico más adecuado para la separación de componentes, se aplicó las condiciones para la inyección y la columna.

2.3.4 *Análisis estadístico*

Para el análisis de datos, se realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias en el contenido de compuestos químicos debido a los métodos de extracción, para ello se utilizó el programa estadístico Statgraphics 19.

Capítulo tres

Resultados y Discusión

Para la presente investigación se hizo el análisis de 35 artículos científicos buscados en las distintas plataformas (PubMed, ScienceDirect, Scopus, Web of Science, Google Académico). Se aplicaron filtros correspondientes como palabras claves; HPLC, mango leaves, antioxidantes, mangiferina, el año 2012-2022, el área de investigación: Ingeniería Química, Alimentos, esto con el fin de mejorar la búsqueda de información. De los mismos se escogieron 4 artículos con su método investigativo, ya que se adaptan más por la información que ofrecían, como se describe en la Tabla 3, pero de todas se eligió la investigación de Fernández Ponce, así mismo basándonos en los estándares disponibles en laboratorio.

Tabla 3

Comparación de Métodos para HPLC

Comparación	7. Guamán-Balcázar et al,2018, Nanopartículas antioxidantes a partir de hojas de mango, supflu	8. Fernández Ponce et al,2015, Hojas de mango compuestos fenólicos antioxidantes, ifset	4.Lingfeng Wu et al,2020 Compuestos fenólicos en variedades de hojas de mango, jpba	1. Dorta et al ,2014 Cribado de compuestos fenólicos HPLC-ESI-QTOF-MS, foodres
Solvente	Extracción subcrítica: CO ₂ /min de caudal de CO ₂ y 1-15 g de disolvente/min de caudal de etanol. PLE: (etanol, etanol – agua 50:50, agua	agua, etanol y la Mezcla etanol/agua 50:50	El ácido fórmico y el acetonitrilo en grado cromatográfico	El etanol y la acetona de grado HPLC metanol: ácido fórmico (99:1, v: v)

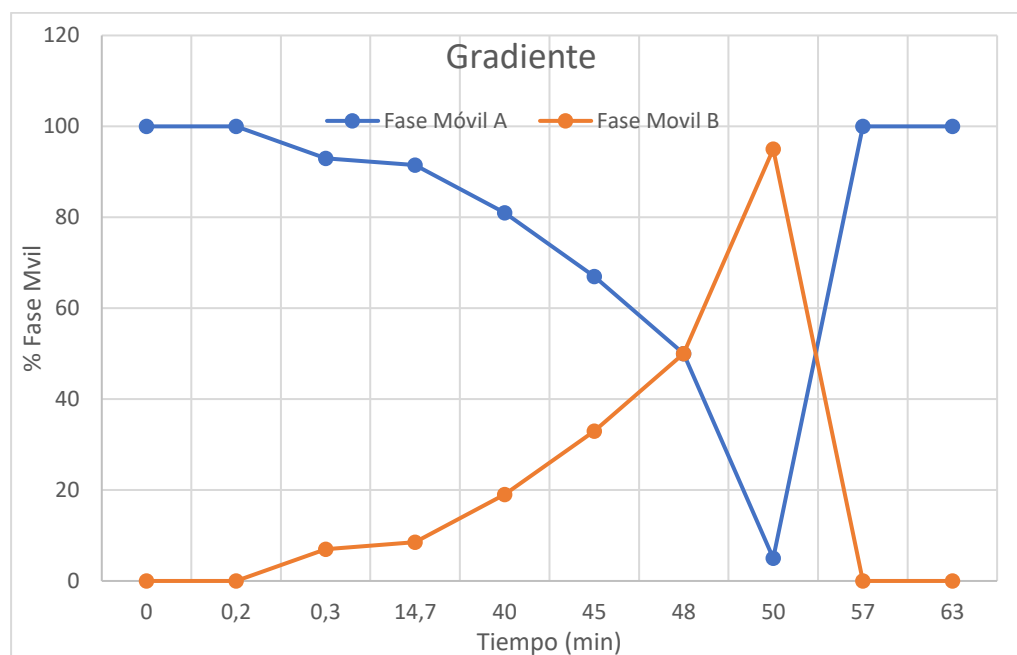
separación a Gradiente	20 %–22 % B (0–10 min), 22 %–22 % B	B [t (min), %B]: (0, 0), (0,2, 0), (0,3, 7), (14.7, 8.5), (40, 19), (45, 33), (48, 50), (50, 95), (57, 0) y (63, 0)	0-5 min, 15 % B; 5-20 min, 15-25 % B; 20-40 min, 25-50 % B; 40-55 min, 80 % B; y 55-60 min, 15 % B.	50 % acetonitrilo, 40 % metanol (que contiene 0,05 % de TEA y 0,05 M de AA), 5 % de cloroformo y 5 % de n-heptano.
Fase móvil	A (0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua) y B (acetonitrilo)	agua/0,1 % de ácido fórmico (disolvente A) y acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1% (disolvente B).	A (0,1 % de ácido fórmico-agua) y la elución B (0,1 % de ácido fórmico-acetonitrilo)	ACN (0,1 % BHT Butil-hidroxitolueno) /MeOH (0,05 M NH ₄ Oac, 0,05 % TEA) /CHCl ₃ (0,1 % BHT) /n-heptano (0,1 % BHT) (50:40:5:5, v/v/v/v)

Nota. Comparaciones de cuatro métodos de HPLC de distintas investigaciones.

3.1 Resultado de la búsqueda bibliográfica del método para HPLC

Estas son las siguientes: Columna C18(250 x 4.6 mm,5 um) a 25 °C. La fase móvil consistió en agua/0,1 % de ácido fórmico (disolvente A) y acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % (disolvente B).

Antes de la inyección en el HPLC los extractos se filtraron, el volumen de inyección para todas las muestras fue de 2 ml para cada vial. Para la fase móvil con un caudal de 0.5 ml/min utilizando un perfil de gradiente lineal con las siguientes proporciones de disolvente B [t (min), %B]: (0, 0), (0,2, 0), (0,3, 7) (14.7, 8.5), (40, 19), (45, 33), (48, 50), (50, 95), (57, 0) y (63, 0), como se puede ver en la Figura 5 (Fernández et al., 2015).

Figura 5*Gradiente de fase móvil*

3.2 Identificación de compuestos fenólicos

Las muestras extraídas por distintas extracciones se analizaron en el equipo de HPLC para conocer los compuestos fenólicos como son mangiferina, ácido gálico y quercetina.

El análisis HPLC-UV a partir de extractos de etanol de hoja de mango mostró diferentes familias de compuestos fenólicos (ácido gálico), flavonoides (Quercetina) y xantonas (Mangiferina).

Permitiendo obtener la elución de ácido gálico a 9.6 min, mangiferina a 35.74 min y quercetina a 53.6 min. El espectro UV del estándar de mangiferina, quercetina y ácido gálico resalta un pico a longitudes de onda del detector UV-VIS 278 – 200 nm de gran área representativa, así mismo con respecto a cada extracto de maceración, ultrasonido, líquido presurizado y co-solvente.

Una vez obtenidas las áreas de las distintas concentraciones de los estándares se llevó a cabo el análisis de datos, ver Apéndice A, para realizar una recta patrón, ver Apéndice B representando el área en el eje frente a la concentración de mangiferina, quercetina, ácido gálico.

Las ecuaciones obtenidas de las gráficas de los compuestos a estudiar y el coeficiente de correlación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Calibración de las curvas de los compuestos fenólicos

Compuesto	Ecuación	Coefficiente de Correlación (r^2)
Mangiferina	$y = 12411x + 314,42$	$R^2 = 0,998$
Quercetina	$y = 35723x + 414,18$	$R^2 = 0,9913$
Ácido Gálico	$y = 33135x - 197,5$	$R^2 = 0,9862$

Nota. En esta tabla se observa las ecuaciones de la recta con su coeficiente de correlación.

Los resultados de los compuestos químicos para las diferentes técnicas de extracción se muestran en la Tabla 5 donde podemos ver la cantidad de concentración de las muestras más la desviación estándar.

Tabla 5

Resultados de los compuestos químicos para las diferentes técnicas de extracción

Técnicas de Extracción	Compuestos Químicos		
	Mangiferina	Quercetina	Ácido Gálico
Maceración	$441,14 \pm 190,07$	$4,85 \pm 0,19$	$12,13 \pm 7,55$
Co-solvente	$166,12 \pm 149,18$	$1,64 \pm 0,66$	$1,53 \pm 1,40$
Ultrasonido	$411,47 \pm 32,23$	$7,49 \pm 4,44$	$13,82 \pm 12,61$
Líquido Presurizado	$184,74 \pm 35,28$	$2,25 \pm 2,17$	$4,75 \pm 3,79$

Nota: Todos los valores son la media de 3 réplicas en mg/g \pm la desviación estándar.

3.2.1 Mangiferina

Bajo el diseño experimental aplicado a los datos en el programa Statgraphics 19 del estudio se hizo un análisis de varianza ANOVA (aplicando análisis de varianza) (Apéndice A) se comprobó que existe una diferencia significativa ($P < 0,05$), como se puede ver en la prueba de múltiple rango realizada Tabla 6 y Figura 6, con un nivel de 95,0 % confianza. El contenido de mangiferina fue el compuesto químico predominante de las hojas estudiadas por las diferentes extracciones, resultando el de mejor extracción por maceración, ya que presenta

441,147 mg/g muy cercano por ultrasonido de 411,47 mg/g, líquido presurizado con 184,743 mg/g y co-solvente 166,12 mg/g como se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 6

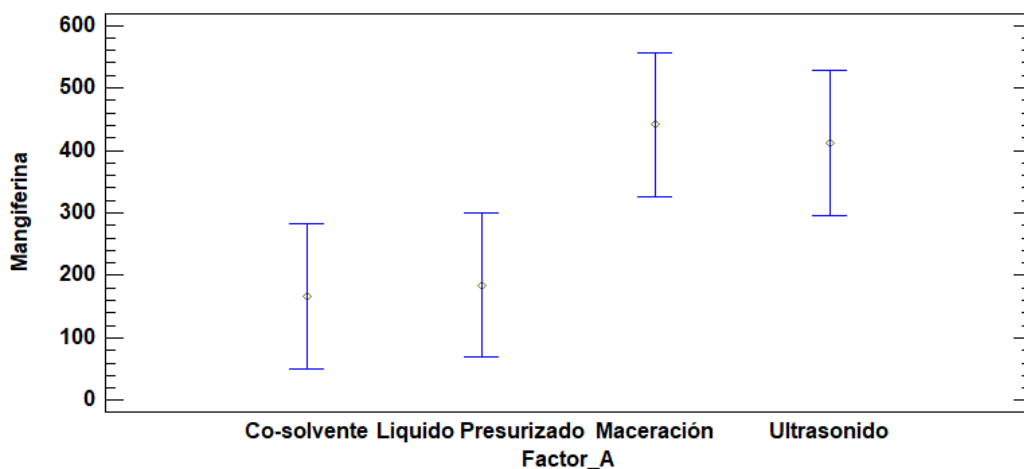
Pruebas de Múltiple Rangos para Mangiferina

<i>Técnicas de Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Co-solvente	3	166,12	X
Líquido Presurizado	3	184,74	XX
Ultrasonido	3	411,47	XX
Maceración	3	441,15	X

Nota. En esta tabla se observa las cantidades de mangiferina en mg/g de extracto.

Figura 6

Mangiferina Medias y 95.0% de Fisher LSD



En el estudio realizado por Jara, (2014) sobre el potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales de mango (*Mangifera indica* L.) donde los extractos fueron obtenidos utilizando etanol – metanol encontró una menor concentración de mangiferina 166 mg/kg ms obtenido por el método de maceración dinámica, sin embargo en el estudio realizado por Banchón & Palma, (2018) donde los extractos fueron obtenidos utilizando metanol encontró una concentración mayor de 15,66 g/g por extracción por soxhlet. En la investigación realizada por Fernández et al., (2015) sobre el uso de técnicas de alta presión para producir extractos de hojas de *Mangifera indica* L. enriquecidos en potentes compuestos

fenólicos antioxidantes, obtuvo igualmente mayor concentración de 23,78 g/100 g extracto seco usando etanol puro como solvente de extracción por líquido presurizado y por extracción co-solvente obtuvieron de la misma manera mayor concentración de 13,42 g/100 g extracto seco. Mientras que en el estudio realizado por (Zou et al., 2014) obtuvo una menor concentración de $58,46 \pm 1,27$ mg/g en extracción por ultrasonido utilizando disolvente etanol acuoso. Para el estudio realizado de Guamán et al., (2018) por extracción co-solvente obtuvieron menor concentración de 276.91 ± 0.14 (mg compuestos/g precipitado), en extracción por líquido presurizado obtuvieron cantidades menores de 94.36 ± 0.18 (mg compuestos/g precipitado) utilizando agua-etanol como solvente. En otro de los estudios realizados por Dorta et al., (2014) obtuvieron mayor concentración de 4.15 ± 0.18 g/100 g de muestra seca por extracción asistida por microondas con etanol - agua como solvente. Siendo menor en algunas, mientras que en otras investigaciones es mayor la concentración en comparación a la obtenida en este estudio.

Esto puede ser debido a la variedad de mango que se utilizó, incluso las condiciones físicas de las hojas y por el solvente de extracción utilizado.

3.2.2 Quercetina

Bajo el diseño experimental aplicado a los datos en el programa Statgraphics 19 del estudio se hizo un análisis de varianza ANOVA (Apéndice A) se comprobó que no existe una diferencia significativa ($P > 0,05$) como se puede ver en la prueba de múltiple rango realizada Tabla 7 y Figura 7, con un nivel de 95,0 % confianza. El contenido de quercetina, un flavonoide, también estuvo presente para las diferentes extracciones, pero fue bajo lo que se encontró para todos los extractos, con la extracción por ultrasonido 7,50 mg/g y 4,85 mg/g, en la extracción cosolvente 2,27 mg/g, muy similar con la extracción líquido presurizado 2,25 mg/g, como se observa en la Tabla 5.

Tabla 7

Pruebas de Múltiple Rangos para Quercetina

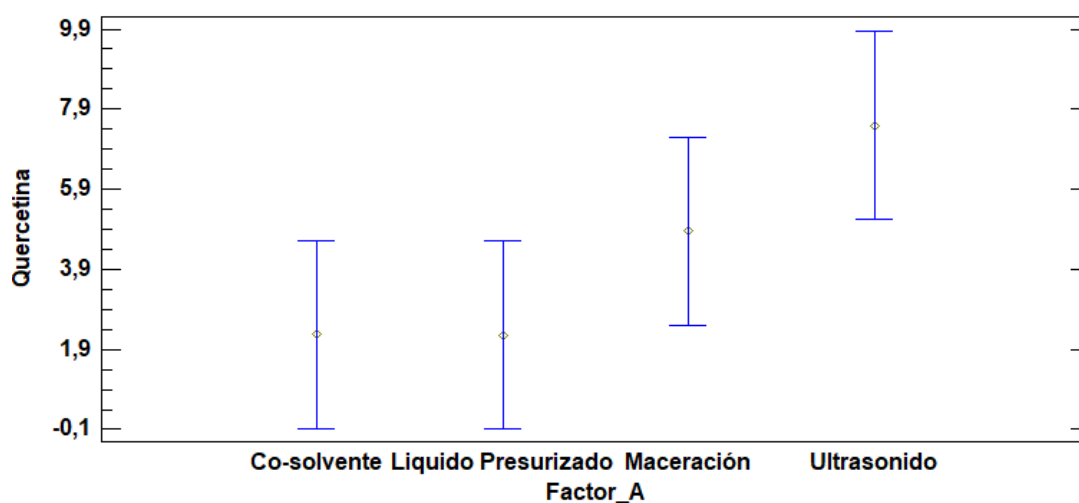
<i>Técnicas de Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
-------------------------------	--------------	--------------	--------------------------

Líquido	3	2,25	X
Presurizado			
Co-solvente	3	2,27	X
Maceración	3	4,85	XX
Ultrasonido	3	7,50	X

Nota. En esta tabla se observa las cantidades de quercetina en mg/g de extracto.

Figura 7

Quercetina Medias y 95.0% de Fisher LSD



En el estudio realizado por Jara, (2014) sobre el potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales de mango (*Mangifera indica* L.) donde los extractos fueron obtenidos utilizando etanol – metanol encontró una menor concentración de quercetina presentando 77 mg/kg ms por maceración dinámica. Sin embargo, en la investigación realizada por Fernández et al., (2015) sobre el uso de técnicas de alta presión para producir extractos de hojas de *Mangifera indica* L. enriquecidos en potentes compuestos fenólicos antioxidantes, no detectaron quercetina usando etanol puro como solvente en la extracción por líquido presurizado y por extracción co-solvente. Para el estudio realizado de Guamán et al., (2018) por extracción co-solvente obtuvieron mayor concentración de 40.55 ± 0.14 (mg compuestos/g precipitado), en extracción por líquido presurizado obtuvieron igualmente cantidades mayores de 53.58 ± 0.45 (mg compuestos/g precipitado) utilizando agua-etanol como solvente. En otro de los estudios realizados por Dorta et al., (2014) obtuvieron de la

misma manera mayor concentración de 33.38 ± 0.94 g/100 g de muestra seca por extracción asistida por microondas con etanol-agua como solvente. Siendo en la mayoría de los estudios analizados mayor cantidad de quercetina que la analizada en esta investigación.

Esto puede ser debido a la variedad de mango que se utilizó, incluso las condiciones físicas de las hojas y por el solvente de extracción utilizado.

3.2.3 Ácido Gálico

Bajo el diseño experimental aplicado a los datos en el programa Statgraphics 19 del estudio se hizo un análisis de varianza ANOVA (Apéndice A) se comprobó que no existe una diferencia significativa ($P > 0,05$) como se puede ver en la prueba de múltiple rango realizada Tabla 8 y Figura 8, con un nivel de 95,0 % confianza. El contenido de ácido gálico que es un flavonoide, el cual muestra muy poco en comparación a la mangiferina y un poco más que la quercetina, resultando por extracción por ultrasonido 13,82 mg/g, seguido la extracción por maceración 12,13 mg/g así mismo la extracción por líquido presurizado con 4,75 mg/g y por último la extracción por co-solvente con 1,53 mg/g como se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 8

Pruebas de Múltiple Rangos para Ácido Gálico

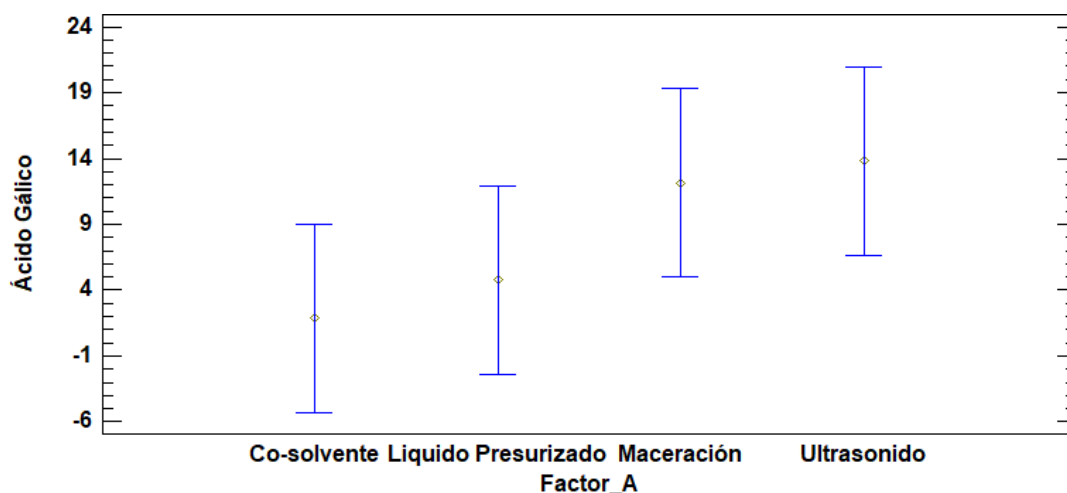
<i>Técnicas de Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Co-solvente	3	1,86333	X
Líquido	3	4,75333	X
Presurizado			
Maceración	3	12,1333	X
Ultrasonido	3	13,8233	X

Nota. En esta tabla se observa las cantidades de ácido gálico

en mg/g de los extractos.

Figura 8

Ácido Gálico Medias y 95.0% de Fisher LSD



En el estudio realizado por Jara, (2014) sobre el potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales de mango (*Mangifera indica* L.) donde los extractos fueron obtenidos utilizando etanol – metanol encontró una mayor concentración de ácido gálico presentando 1471 mg/kg ms por maceración dinámica. Mientras que en el estudio realizado por Banchón & Palma, (2018) donde los extractos fueron obtenidos utilizando metanol, encontró igualmente una mayor concentración de ácido gálico de 276,24 mg/ml por extracción soxhlet. De la misma manera, en la investigación realizada por Fernández et al., (2015) sobre el uso de técnicas de alta presión para producir extractos de hojas de *Mangifera indica* L. enriquecidos en potentes compuestos fenólicos antioxidantes, usando etanol puro como solvente de extracción por líquido presurizado obtuvieron una mayor concentración de 4,48 g/100 g seco y por extracción co-solvente igualmente mayor de 3,02 g/100 g seco. Para el estudio realizado de Guamán et al., (2018) por extracción co-solvente obtuvieron 44.67 ± 0.10 (mg compuestos/g precipitado), en extracción por líquido presurizado obtuvieron del mismo modo con cantidades mayores de 21.54 ± 0.11 (mg compuestos/g precipitado) utilizando agua-etanol como solvente. En otro de los estudios realizados por Dorta et al., (2014) obtuvieron mayor concentración de 36.09 ± 2.24 g/100 g de muestra seca por extracción asistida por microondas con etanol-agua como solvente. Siendo en todos los

estudios analizados es mayor la cantidad de concentración de ácido gálico en comparación a nuestra presente investigación.

Esto puede ser debido a la variedad de mango que se utilizó, incluso las condiciones físicas de las hojas y por el solvente de extracción utilizado.

Conclusiones

El extracto de hojas de *Mangifera indica L.* exhibe efectos antioxidantes, gracias al contenido de compuestos polifenólicos como derivados de benzofenonas, flavonas y xantonas que se pudo cuantificar por el método HPLC que consistió en la mezcla agua/0,1 % de ácido fórmico como (disolvente A) y la mezcla de acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % como (disolvente B) Los extractos estudiados fueron por diferentes extracciones como: maceración, ultrasonido, líquido presurizado y co-solvente, esto en orden de mayor cantidad de concentración a menor cantidad de concentración de los compuestos químicos estudiados utilizando etanol como solvente.

Las condiciones cromatográficas de HPLC UV utilizado permitió identificar la mangiferina con una mayor cantidad de concentración extraída por maceración fue 441,14 mg/g, ácido gálico de 13,82 mg/g por ultrasonido y quercetina 7,49 mg/g mediante la extracción por ultrasonido en los extractos de las hojas de Mango.

Recomendaciones

Validar el método analítico utilizado para asegurar la calidad de los resultados y tener claro el solvente a utilizar durante todo el proceso del estudio.

A partir de los altos valores de mangiferina detectados se pudieran establecer estudios preclínicos para evaluar el potencial en uso de biopelículas comestibles y así mismo en la rama de la farmacología, nutracéuticas, cosméticas e industria alimentaria, ya que son una fuente rica de potentes antioxidantes fenólicos.

Referencias

- Acosta, J., Salomón, S., Sevilla, I., & Nuevas, L. (2016). Use of ultrasound for extraction of the apolar fraction in leaves of *Mangifera indica* L. (mango tree). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3).
- Agostina, R., Pablo, J., Mabel, B., & Adriana, P. (2016). *Utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para determinar consumo de sustrato*. 1–8.
- Banchón, B., & Palma, J. (2018). *Cuantificación de mangiferina en diferentes variedades de mango (Mangifera Indica L.) De exportación en el ecuador*.
- Benítez, A., Villanueva, J., González, G., Alcántar, V., Puga, R., & Quintero, A. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Benítez, J. (2020). *Caracterización química y funcional de los extractos de hojas de mango, olivo y hollejo de uva tinta obtenidos a partir de extracción con líquidos presurizados y sus aplicaciones en el campo de la biomedicina*. <http://hdl.handle.net/10498/23398>
- Carrión, A., & García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. *Universidad de Cuenca, Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmacéutica*.
- Corrales, I., Reyes, J., & González, R. (2014). Plantas medicinales de interés estomatológico. *Revista 16 de abril*, 53, 79–98.
- Coto, C. (2014). *Desarrollo de dos licores a partir de la mezcla de frutas mediante el método de maceración*.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., & de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.01.012>

- Fernández, M., & Casas, L. (2011). *Extracción Supercrítica De Compuestos Fenólicos Antioxidantes A Partir De Hojas De Mango (Mangifera Indica L.)*. <https://n9.cl/a2dpz>
- Fernández, M., Casas, L., Mantell, C., & Martínez de La Ossa, E. (2015). Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.006>
- Figuroa, J. (2018). *Caracterización de compuestos fenólicos de subproductos de origen vegetal mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas y evaluación de la actividad biológica*. <http://hdl.handle.net/10481/53827>
- Fomenko, E. V., & Chi, Y. (2016). Mangiferin modulation of metabolism and metabolic syndrome. In *BioFactors* (Vol. 42, Issue 5, pp. 492–503). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/biof.1309>
- Gioffre, P. (2020, October 12). *Métodos de extracción y purificación de flavonoides - Cosmetic Latam*. <https://n9.cl/dg23k>
- Guamán, M., Montes, A., Fernández, M., Casas, L., Mantell, C., Pereyra, C., & Martínez de la Ossa, E. (2018). Generation of potent antioxidant nanoparticles from mango leaves by supercritical antisolvent extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 138, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.04.005>
- Jara, S. (2014). *Potencial antioxidante de los subproductos agroindustriales de mango (Mangifera Indica L.)*.
- Maldonado, Y., Navarrete, H., Ortiz, Ó., Jiménez, J., Salazar, R., Alia, I., & Álvarez, P. (2016). Propiedades físicas, químicas y antioxidantes de variedades de mango crecidas en la costa de Guerrero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(3). <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.3.207-214>
- Malheiros, G. (2023, January 6). *Global mango market on track to grow 5% per year until 2029*. Datamar News.

- Martínez Colorado, J. P. (2016). Obtención del extracto coloreado remanente de los marcadores borrables utilizados en la escuela de química de la Universidad Tecnológica de Pereira. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9).
- Martínez, J., Mantell, C., Cardoso, L., & Fernandez, M. (2014). *Extractos fenólicos de Mangifera indica Linn, procedimiento de obtención y usos.*
- Masud Parvez, G. M. (2016). Pharmacological Activities of Mango (Mangifera Indica): A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3).
- Mitra, S. K. (2016). Mango production in the world - present situation and future prospect. *Acta Horticulturae*, 1111, 287–296. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2016.1111.41>
- Montoya, A. (2021). *Oportunidades para las exportaciones de mango ecuatoriano.* <https://www.freshplaza.es/article/9372111/oportunidades-para-las-exportaciones-de-mango-ecuatoriano/>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria: Órgano Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 27(1).
- Rangel, J., & Orozco, J. (2014). *Establecimiento de cultivos in vitro de Albahaca (Ocimum Basilicum) para la producción de Aceite Esencial.*
- Rodríguez, L. (2019). *Aplicación de enzimas en la obtención de aceite de girasol con solventes renovables: impacto del procesamiento en la composición y calidad de aceites y harinas.*
- Rojas, T., Fuentes, M., Contreras, E., Gómez, S., & Muñoz, A. (2019). *Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (Corryocactus brevistylus).*
- Román, M., Rivera, C., Cardona, L., Muñoz, L., Gomez, D., Carvalho, C., & Quiceno, J. (2016). *Guía de extracción por fluidos supercríticos: fundamentos y aplicaciones.*
- Sánchez, A. del P., Ibáñez, E., Cifuentes, A., & Herrero, M. (2017). Bioactives Obtained From Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 76. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.01.001>

- Torres, R. D., Tomalá, C. J. J. C., Sancán, J. L. Z., Águila, M. A. G., & Ramírez, E. E. T. (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas de tres variedades de *Mangifera indica* L. *Cumbres*, 3(2), 61–69. <https://doi.org/10.48190/CUMBRES.V3N2A6>
- Triana, E. (2016). *Selección del método de extracción en base al rendimiento y los resultados del tamizaje fitoquímico en extractos de las hojas de Mangifera indica L.*
- Vilca, Y. (2019). *Estudio de las condiciones óptimas de extracción mediante fluido supercrítico del extracto de las hojas de chiriyuyo (Kalanchoe pinnata).*
- Zambrano, J., & García, M. (2016). *Determinación de la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de Mangifera indica L. por diferentes métodos de extracción.*
- Zou, T., Xia, E., He, T., Huang, M., Jia, Q., & Li, H. (2014). Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 19, 1411–1421. <https://doi.org/10.3390/molecules19021411>

Apéndice

Apéndice A. Tablas

Tabla A1

Mangiferina con sus concentraciones, área y tiempo de retención

Mangiferina es una xantona PM:422,3			
Concentración mg/ml	Área (100%)	# del cromatograma	TR
0,500	6491,02	15	35,7
0,250	3459,65	12	35,8
0,063	1223,86	11	35,8
0,031	554,72	9	35,7

Nota. En esta tabla se observan las áreas y tiempos de retención de cada concentración del estándar de mangiferina.

Tabla A2

Quercetina con sus concentraciones, áreas y tiempo de retención

Quercetina Flavonoide PM: 302,24 Antioxidante			
Concentración mg/ml	Área (100%)	# del cromatograma	TR
0,500	18069,44	16	53,6
0,125	5973,04	10	53,6
0,050	1740,91	10	53,6
0,025	879,16	8	53,6

Nota. En esta tabla se observan las áreas y tiempos de retención de cada concentración del estándar de quercetina.

Tabla A3

Ácido gálico con su concentración, área y tiempo de retención

Ácido Gálico ácido orgánico PM: 170,13			
--	--	--	--

Concentración mg/ml	Área (100%)	# del cromatograma	TR
0,500	16869,62	7	6,4
0,050	1286,20	7	9,2
0,025	812,49	6	9,8
0,013	245,02	7	9,7

Nota. En esta tabla se observan las áreas y tiempos de retención de cada concentración del estándar de ácido gálico.

Tabla A4

Cálculos de concentraciones de los estándares

Mangiferina							$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$		$V1 = C2 \cdot V2 / C1$		V2 2 ml			
concentración=					C1	ppm								
14	1	mg	14	mg	1000	ppm								
14		ml	0,014	L	C2	ppm	$V1 = C2 \cdot V2 / C1$	ml	$V1 = C2 \cdot V2 / C1$	uL	completar vial con etanol	ml	completar vial con etanol	uL
	0,500	mg/ml			500	ppm	1,00	ml	1000	uL	1,00	ml	1000	uL
	0,250	mg/ml			250	ppm	0,50	ml	500	uL	1,50	ml	1500	uL
	0,063	mg/ml			62,5	ppm	0,125	ml	125	uL	1,88	ml	1875	uL
	0,031	mg/ml			31,25	ppm	0,0625	ml	62,5	uL	1,94	ml	1938	uL

Quercetina							$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$		$V1 = C2 \cdot V2 / C1$		V2 2 ml			
concentración=					C1	ppm								
14	1	mg	14	mg	1000	ppm								
14		ml	0,014	L	C2	ppm	$V1 = C2 \cdot V2 / C1$	ml	$V1 = C2 \cdot V2 / C1$	uL	completar vial con etanol	ml	completar vial con etanol	uL
	0,500	mg/ml			500	ppm	1,00	ml	1000	uL	1,00	ml	1000	uL
	0,125	mg/ml			125	ppm	0,25	ml	500	uL	1,50	ml	1500	uL
	0,050	mg/ml			50	ppm	0,10	ml	100	uL	1,90	ml	1900	uL
	0,025	mg/ml			25	ppm	0,05	ml	50	uL	1,95	ml	1950	uL

Ácido Gálico						$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$		V2		2		ml		
concentración=						C1	ppm							
14	1	mg	14	mg	1000	ppm								
14		ml	0,014	L	C2	ppm	$V1 = C2 \cdot V2 / C1$	ml	$V1 = C2 \cdot V2 / C1$	uL	completar vial	ml	completar vial	uL
	0,500	mg/ml			500	ppm	1,00	ml	1000	uL	1,00	ml	1000	uL
	0,050	mg/ml			125	ppm	0,25	ml	250	uL	1,75	ml	1750	uL
	0,025	mg/ml			62,5	ppm	0,125	ml	125	uL	1,88	ml	1875	uL
	0,013	mg/ml			31,25	ppm	0,0625	ml	62,5	uL	1,94	ml	1938	uL

Tabla A5

Preparación de fase móvil

HPLC 40
 Va a fluir o efluye a hplc 0,5 ml/min
 Muestras (12) + estándares (15) = 27 muestras

A= Agua (destilada filtrada) hplc
 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂)

Tiempo(min)		A (%)	A(ml)	B (%)	B(ml)
0	0	100	0	0	0
0,2	0,2	100	0,1	0	0
0,3	0,1	93	0,0465	7	0,0035
14,7	14,4	91,5	6,588	8,5	0,612

B= Acetonitrilo
 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂)

% v/v= volumen de soluto 100% 10/100

40	25,3	81	10,2465	19	2,4035
45	5	67	1,675	33	0,825
48	3	50	0,75	50	0,75
50	2	5	0,05	95	0,95
57	7	100	3,5	0	0
63	6	100	3	0	0
	63		25,956		5,544

volumen de disolución	0,10%	0,6
volumen de soluto =	(% v/v) *volumen de disolución/100%	0,2
en un tiempo	63	min
	31,5	ml
Suma total		
	31,5	ml
	630	ml

A ácido fórmico CH₂O₂
 B ácido Fórmico CH₂O₂

Para unas 40 muestras redondeando para la limpieza porque en si son 27 muestras
 Volumen de redondeando disolución

Agua H₂O destilada hplc

Acetonitrilo C₂H₃CN

519,12 ml
 110,88 ml
 600 ml
 150 ml

630 ml
 630 ml
 750 ml total

Tabla A6

Cálculos de las concentraciones de las muestras o extractos.

Muestras	Pesos muestras (g)	Pesos Muestras (mg)	etanol (ml)	Concentración mg/ml	ml Tomar alícuota y poner el vial						
Maceración 1	0,03	30,00	10	3,00	2	$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ $V1 = C2 \cdot V2 / C1$	<table border="1"> <tr> <td>V</td> <td>2</td> <td>ml</td> </tr> </table>	V	2	ml	
V	2	ml									
Maceración 2	0,03	30,00	10	3,00	2						
Maceración 3	0,03	30,00	10	3,00	2						
Ultrasonido 1	0,03	30,00	10	3,00	2						
Ultrasonido 2	0,03	30,00	10	3,00	2		$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ $V1 = C2 \cdot V2 / C1$	<table border="1"> <tr> <td>V2</td> <td>2</td> <td>ml</td> </tr> </table>	V2	2	ml
V2	2	ml									
Ultrasonido 3	0,03	30,00	10	3,00	2	Ácido Gálico					
Líquido Presurizado 1	0,03	30,00	10	3,00	2	concentración=	C1	ppm			

Liquido Presurizado 2	0,03	30,00	10	3,00	2	10	1	mg	10	m	10	pp								
Liquido Presurizado 3	0,03	30,00	10	3,00	2	10		ml	0,01	L	C2	pp	$V1=C2*V2/C1$	m	$V1=C2*V2/C1$	u	completar vial	m	completar vial	u
Co-solvente 1	0,03	30,00	10	3,00	2		0,500	mg/ml			500	pp	1,00	m	1000	u	1,00	m	1000	u
Co-solvente 2	0,03	30,00	10	3,00	2		0,250	mg/ml			250	pp	0,50	m	500	u	1,50	m	1500	u
Co-solvente 3	0,03	30,00	10	3,00	2		0,125	mg/ml			125	pp	0,25	m	250	u	1,75	m	1750	u
Total	0,03	360,00	120	36,00	24		0,063	mg/ml			62,5	pp	0,13	m	125	u	1,88	m	1875	u
							0,031	mg/ml			31,3	pp	0,06	m	62,5	u	1,94	m	1938	u
Concentración de las muestras	3000	ppm					10	ml	etanol								8,06	m	8062,5	u

Concentración de las muestras	3000	ppm
	3000	mg/L
	2	mg/ml
	0	ml etanol

TOTAL,
138,06 ml

2	ml de inyecci ón

ETAN
OL

150 ml

Tabla A7*Cantidad de Muestra de Mangiferina*

Mangiferina						
Muestras	Área 100%	Ecuación	m		Cantidad	Mangiferina/Extracto
			12411	314,42		
Maceración 1	24807,73	x=	1,97	mg/ml	657,84	mg/g
Maceración 2	13828,76	x=	1,09	mg/ml	362,97	mg/g
Maceración 3	11582,42	x=	0,91	mg/ml	302,63	mg/g
Ultrasonido 1	14425,87	x=	1,14	mg/ml	379,00	mg/g
Ultrasonido 2	16825,24	x=	1,33	mg/ml	443,45	mg/g
Ultrasonido 3	15652,82	x=	1,24	mg/ml	411,96	mg/g
Liquido Presurizado 1	6589,63	x=	0,51	mg/ml	168,54	mg/g
Liquido Presurizado 2	6289,76	x=	0,48	mg/ml	160,48	mg/g
Liquido Presurizado 3	8699,79	x=	0,68	mg/ml	225,21	mg/g
Co-solvente 1	12872,87	x=	1,01	mg/ml	337,29	mg/g
Co-solvente 2	3935,85	x=	0,29	mg/ml	97,26	mg/g
Co-solvente 3	2690,28	x=	0,19	mg/ml	63,81	mg/g

Tabla A8*Cantidad de Muestra de Quercetina*

Quercetina						
Muestras	Área	Ecuación	m	b	Cantidad	Mangiferina/Extracto
			35723	414,18		
Maceración 1	944,64	x=	0,01	mg/ml	4,95	mg/g
Maceración 2	909,93	x=	0,01	mg/ml	4,63	mg/g
Maceración 3	947,75	x=	0,01	mg/ml	4,98	mg/g
Ultrasonido 1	1766,30	x=	0,04	mg/ml	12,62	mg/g
Ultrasonido 2	945,49	x=	0,01	mg/ml	4,96	mg/g
Ultrasonido 3	940,17	x=	0,01	mg/ml	4,91	mg/g
Liquido Presurizado 1	924,33	x=	0,01	mg/ml	4,76	mg/g
Liquido Presurizado 2	527,13	x=	0,00	mg/ml	1,05	mg/g
Liquido Presurizado 3	516,22	x=	0,00	mg/ml	0,95	mg/g
Co-solvente 1	739,06	x=	0,01	mg/ml	3,03	mg/g
Co-solvente 2	614,25	x=	0,01	mg/ml	1,87	mg/g
Co-solvente 3	617,35	x=	0,01	mg/ml	1,90	mg/g

Tabla A9*Cantidad de Muestra de Ácido Gálico*

Ácido Gálico						
Muestras	Área	Ecuación	m		Cantidad	Mangiferina/Extracto
			33135	197,5		
Maceración 1	2265,31	x=	0,06	mg/ml	20,80	mg/g
Maceración 2	1057,57	x=	0,03	mg/ml	8,65	mg/g
Maceración 3	888,25	x=	0,02	mg/ml	6,95	mg/g
Ultrasonido 1	876,89	x=	0,02	mg/ml	6,83	mg/g
Ultrasonido 2	3018,13	x=	0,09	mg/ml	28,38	mg/g
Ultrasonido 3	819,93	x=	0,02	mg/ml	6,26	mg/g
Liquido Presurizado 1	974,93	x=	0,02	mg/ml	7,82	mg/g
Liquido Presurizado 2	786,12	x=	0,02	mg/ml	5,92	mg/g
Liquido Presurizado 3	249,55	x=	0,00	mg/ml	0,52	mg/g
Co-solvente 1	500,56	x=	0,01	mg/ml	3,05	mg/g
Co-solvente 2	326,99	x=	0,00	mg/ml	1,30	mg/g
Co-solvente 3	320,33	x=	0,00	mg/ml	1,24	mg/g

Tabla A10*ANOVA de Mangiferina*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	190659,	3	63552,9	4,19	0,0467
Intra grupos	121329,	8	15166,1		
Total (Corr.)	311987,	11			

Tabla A11*ANOVA de Quercetina*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	56,4628	3	18,8209	3,03	0,0935
Intra grupos	49,7539	8	6,21923		
Total (Corr.)	106,217	11			

Tabla A12*ANOVA de Ácido Gálico*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	297,339	3	99,113	1,71	0,2412
Intra grupos	462,92	8	57,865		
Total (Corr.)	760,259	11			

Apéndice B. Figuras

Figura B1

Recta patrón de Mangiferina

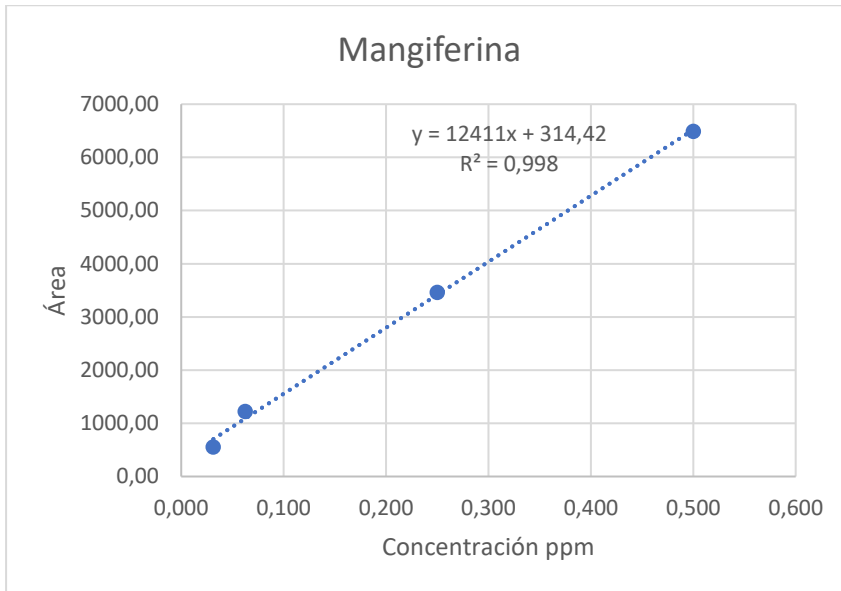


Figura B2

Recta patrón de Quercetina

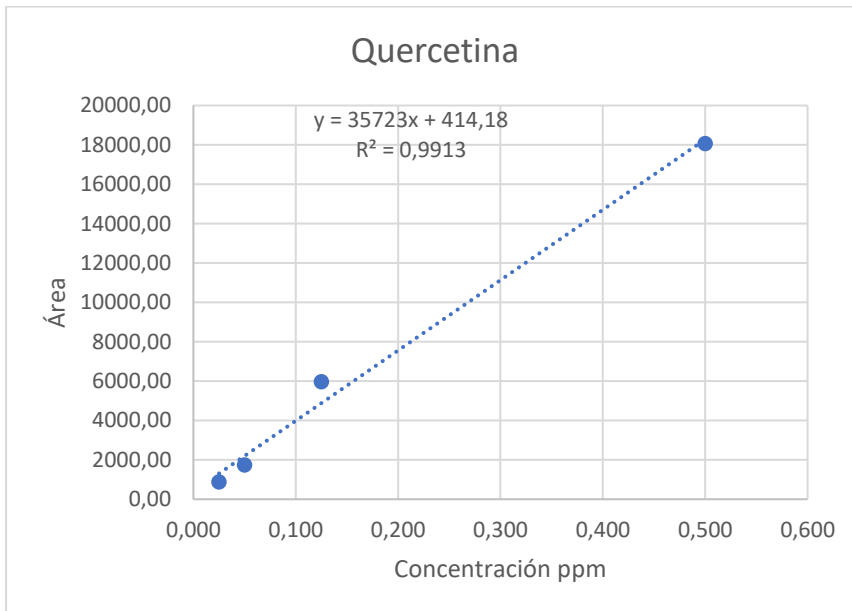
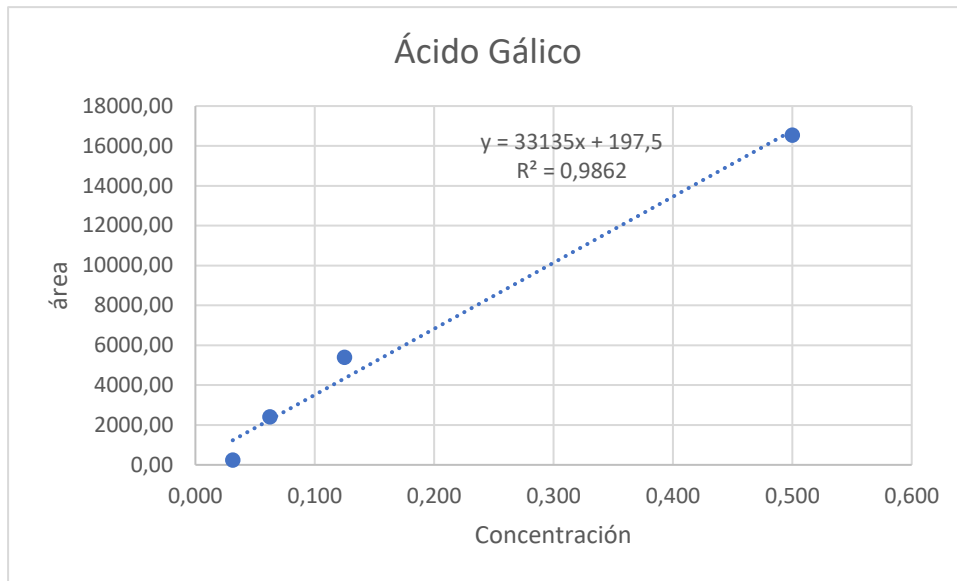


Figura B3

Recta patrón de ácido gálico



Apéndice C. Nomenclatura

NOMENCLATURA

EtOH: Etanol absoluto

MeOH: Metanol

ACN: Acetonitrilo

HCOOH: Ácido Fórmico

C₁₉H₁₈O₁₁: Mangiferina

C₁₅H₁₀O₇: Quercetina

C₆H₂(OH)₃COOH: Ácido Gálico

0.1 M: Molar

ml: Mililitro

μL: Microlitro

g: Gramo

mg: Miligramo

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

MS: Espectrometría de masas

C: Concentración.

V: Volumen

PPM: Partes por millón.

TR: Tiempo de Retención

ANOVA (Análisis de varianza)