

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SEDE DE OCCIDENTE

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN
LABORATORISTA QUÍMICO**

Determinación del perfil de polifenoles en frutos de plantas de guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera nativas de Costa Rica, con potencial anti-fúngico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Katherine Vanessa Gómez Pérez

2022

HOJA DE APROBACIÓN

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

Determinación del perfil de polifenoles en frutos de plantas de guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera nativas de Costa Rica, con potencial antifúngico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

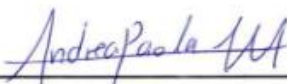
Aprobado por:

Mag. Diego Guerrero Oviedo
Presidente del tribunal.



Luis Alexis JB.

Mag. Luis Jimenez Barboza
Miembro del tribunal.



Andrea Paola MA

Dra. Andrea Irías Mata
Directora de tesis.



A. V. M.

Dra. María Viñas Meneses
Miembro asesor(a).



A. G. Q.

Mag. Andrea García Quesada
Miembro asesor(a).



Katherine Vanessa Gómez Pérez
Sustentante

DEDICATORIA

A mi querido hermano, porque siempre fuiste un ejemplo para mí de superación, de resiliencia, de fortaleza e inspiración. Por cuidarnos desde siempre incluso ahora que ya no estás, te dedico este pequeño esfuerzo cumpliendo la promesa que te hice e intentando cada día ser mejor como persona y como profesional en tu memoria. Cada palabra fue escrita con el sentir de lo orgulloso que estarías de tu pequeña hermana, te llevo siempre en mi corazón y en cada uno de mis logros está reflejada la huella que has dejado en mi vida.

A ti querida hija, por iluminar mi camino cada día, me llenas de fortaleza, amor, sabiduría y paciencia, llegaste a mi vida en el momento justo y quiero ser para ti un ejemplo y enseñarte de que a pesar de los malos momentos que atravesemos en la vida, al igual que los lirios podemos florecer en medio del desierto.

A mis profesoras (es), amigas (os) y familiares que me apoyaron y guiaron a lo largo de este proyecto, su ayuda fue imprescindible para concluir esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	iii
Índice de contenido.....	iv
Índice de abreviaturas.....	viii
Índice de figuras	x
Índice de cuadros	xi
Índice de ecuaciones	xii
Índice de cromatogramas.....	xiii
Resumen	xiv
1. Introducción	16
1.1. Planteamiento del problema	16
1.2. Justificación de la investigación	17
1.3. Antecedentes.....	19
1.4. Objetivos.....	22
1.4.1. Objetivo general	22
1.4.2. Objetivos específicos	23
2. Marco teórico	24
2.1. Características y clasificación de los polifenoles	24
2.2. Información y clasificación botánica de los frutos.....	27

2.2.1. Palma aceitera.....	27
2.2.2. Marañón	28
2.2.3. Nance	28
2.2.4. Guanábana.....	28
2.2.5. Jocote.....	29
2.2.6. Pitahaya roja.....	29
2.3. Extracción de polifenoles en matrices vegetales.....	29
2.4. Métodos de identificación y cuantificación de polifenoles.....	30
3. Marco metodológico.....	36
3.1. Origen y pretratamiento de las muestras	36
3.2. Verificación de la metodología analítica.....	37
3.2.1. Linealidad	38
3.2.1.1. Criterio de aceptación.....	38
3.2.2. Precisión (repetibilidad o precisión intermedia).....	38
3.2.2.1. Criterio de aceptación.....	39
3.2.3. Veracidad y recuperación	39
3.2.3.1. Criterio de aceptación.....	39
3.3. Extracción de polifenoles	39
3.4. Identificación y cuantificación de polifenoles.....	40
3.5. Análisis estadístico	42

4. Resultados.....	43
4.1. Pretratamiento de los frutos	43
4.2. Verificación de la metodología analítica	44
4.2.1. Verificación de la linealidad	44
4.2.2. Verificación de la precisión	48
4.2.3. Verificación de exactitud y recuperación	51
4.3. Extracción de polifenoles en los frutos	53
4.4. Identificación y cuantificación de polifenoles por cromatografía líquida de alta resolución	54
5. Discusión	68
5.1. Tratamiento de los frutos	68
5.2. Verificación de la metodología analítica	69
5.3. Extracción de polifenoles	72
5.4. Identificación y cuantificación de polifenoles en frutos	73
6. Conclusiones y recomendaciones.....	79
6.1. Conclusiones	79
6.2. Recomendaciones	80
Bibliografía.....	82
Anexos.....	95

Anexo 1. Resultado del pretratamiento de extracción por Soxhlet y el

pretratamiento de liofilización y molienda, aplicados a los frutos en estudio	95
Anexo 2. Curvas de calibración de los estándares de polifenoles obtenidas del proceso de validación en la prueba de linealidad	96
Anexo 3. Cromatogramas de las 2 curvas de calibración de los estándares de polifenoles preparadas para la evaluación de la linealidad del método en el proceso de validación	101
Anexo 4. Cromatograma obtenido del estándar de ácido o-coumárico para evaluación de la exactitud y recuperación del proceso de validación del método	103
Anexo 5. Cromatogramas de la identificación y cuantificación de polifenoles en los frutos de palma aceitera, guanábana, jocote, nance, marañón y palma aceitera por HPLC	104
Anexo 6. Ejemplo de aplicación de la prueba de Grubbs para la eliminación de datos atípico	108

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%(v/v): Porcentaje volumen/volumen.

Cigras: Centro para Investigaciones en Granos y Semillas.

Cn µg/g: concentración en microgramos/gramos.

Cn µg/ml: Concentración en microgramos/mililitros.

CV: Coeficiente de variación.

DW: En peso seco.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FDA: U.S. Food and Drugs Administration

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas.

ICH: International Conference on Harmonisation

LC: Límite de cuantificación.

LD: Límite de detección

LLOQ: Límite de detección más bajo.

mg: Miligramos.

nd: No detectado.

nm: Nanómetro.

PCA: Principal Component Analysis.

Ph.Eur: Farmacopea europea.

RSD: Desviación estándar relativa

S: Desviación estándar

\bar{x} : Promedio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de síntesis de compuestos fenólicos en plantas	25
Figura 2. Flujo del procedimiento de extracción de polifenoles usando el fruto de palma aceitera como ejemplo	40
Figura 3. Ejemplo del uso de la técnica de liofilizado para el pretratamiento en el fruto de marañón (A) y del proceso de extracción de grasas por Soxhlet en el fruto de palma aceitera (B).....	44
Figura 4. Extractos de polifenoles que se obtienen a partir de los frutos de jocote (A), pitahaya roja (B), marañón (C), nance (D), guanábana (E) y palma aceitera (F)	54
Figura 5. Análisis de componentes principales de polifenoles solubles en los frutos.....	65
Figura 6. Análisis de componentes principales de polifenoles insolubles en los frutos.....	66
Figura 7. Resultado final del pretratamiento de los frutos con proceso de extracción con Soxhlet, secado y molienda para palma aceitera (A) y proceso de liofilizado y molienda para los frutos de marañón (B), guanábana (C), nance (D), jocote (E) y pitahaya roja (F)	95
Figura 8. Aplicación de la prueba de Grubbs para la eliminación de datos atípicos del polifenol de rutina presente en la palma aceitera	109

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación general de polifenoles.....	26
Cuadro 2. Condiciones de análisis del sistema cromatográfico.....	41
Cuadro 3. Orden de elución de la gradiente de la fase móvil	41
Cuadro 4. Resultados de linealidad de las curvas de calibración	45
Cuadro 5. Resultados del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	47
Cuadro 6. Resultados de la repetibilidad de método analítico	49
Cuadro 7. Resultados para la evaluación de la exactitud durante la validación de la metodología analítica.	52
Cuadro 8. Resultados del porcentaje de recuperación del estándar de ácido o-coumárico en la verificación de la metodología analítica.....	52
Cuadro 9. Tiempo de retención de los estándares de polifenoles y su espectro ultravioleta-visible (Uv-Vis) para la identificación de polifenoles en los frutos en estudio.	55
Cuadro 10. Polifenoles presentes en el fruto de palma aceitera	56
Cuadro 11. Polifenoles presentes en el fruto de marañón.....	58
Cuadro 12. Polifenoles presentes en el fruto de nance	59
Cuadro 13. Polifenoles presentes en el fruto de guanábana	60
Cuadro 14. Polifenoles presentes en el fruto de pitahaya roja	62
Cuadro 15. Polifenoles presentes en el fruto de jocote	63

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del promedio	33
Ecuación 2. Fórmula para el cálculo del error relativo	34
Ecuación 3. Fórmula para el cálculo de la desviación estándar	34
Ecuación 4. Fórmula para el cálculo del intervalo de confianza	35
Ecuación 5. Fórmula para el cálculo de T para un dato sospechoso que se encuentre en el límite superior de los datos	108

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1. Curva de calibración en un rango de 1 a 45 µg/ml llamado Mix#1, compuesto por 17 estándares de polifenoles.....	101
Cromatograma 2. Curva de calibración preparada en un rango de 4 a 180 µg/g denominado Mix 2, compuesto por 2 estándares de polifenoles	101
Cromatograma 3. Mezcla de estándares de polifenoles que se utilizan para identificar el tiempo de retención de cada uno para la prueba de validación de la metodología analítica	102
Cromatograma 4. Recuperación del estándar de ácido o-coumárico preparado a una concentración a nivel medio (80 µg/ml) en una muestra de jocote	103
Cromatograma 5. Recuperación del estándar de ácido O-coumárico preparado a una concentración a nivel medio (80 µg/ml) en una muestra de guanábana	103
Cromatograma 6. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de nance.....	104
Cromatograma 7. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de marañón	104
Cromatograma 8. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de palma aceitera	105
Cromatograma 9. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de guanábana.....	106
Cromatograma 10. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de pitahaya roja	107
Cromatograma 11. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de jocote	107

RESUMEN

Los polifenoles son metabolitos secundarios, que poseen una estructura química que les proporciona capacidades antioxidantes y antimicrobianas y, por esto, son de gran interés para la industria agroalimentaria. Ante la gran incidencia de contaminación de granos por micotoxinas, el empleo de polifenoles como método para la inhibición del crecimiento de hongos que producen micotoxinas es una técnica que poco a poco está despertando el interés de las personas investigadoras. En esta tesis se realizó la determinación del perfil de polifenoles en los frutos de palma aceitera, marañón, nance, guanábana, jocote y pitahaya roja de plantas nativas de Costa Rica por medio de cromatografía líquida de alta resolución. Se llevó a cabo la extracción de polifenoles de fracciones solubles e insolubles en cada uno de los frutos, así como la validación de la metodología analítica. Se logró identificar y cuantificar alrededor de 12 tipos de polifenoles en palma aceitera, 9 tipos en marañón, 11 tipos en nance, 8 tipos en guanábana, 7 tipos en pitahaya roja y 5 tipos en jocote. El análisis de componentes principales demostró similitudes entre el perfil de compuestos fenólicos entre el fruto de marañón y nance compartiendo la presencia de ácido gálico y quercetina. También se encontraron similitudes en los frutos de guanábana, jocote y palma aceitera al presentar los polifenoles de ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido clorogénico y rutina. La pitahaya roja, en cambio, mostró un perfil más particular debido a que fue el único fruto en presentar los polifenoles de epigallocatequina, naringenina y ácido p-coumárico. Con base en los resultados de concentración y tipo de polifenol determinado en cada fruto se sugiere que el fruto de marañón, el cual presentó la concentración más alta de polifenoles totales (3472 $\mu\text{g/g}$), es el que puede tener mayor potencial antifúngico en pruebas *in vitro* posteriores. En segundo lugar, estaría el fruto de nance que presentó una concentración de polifenoles totales de 1046 $\mu\text{g/g}$ mientras que el fruto de pitahaya roja y la guanábana presentaron una concentración de 462 $\mu\text{g/g}$ y 400 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Los frutos que presentaron la menor concentración de polifenoles totales fueron la palma aceitera (257 $\mu\text{g/g}$) y el jocote (218 $\mu\text{g/g}$).

Palabras clave: perfil de polifenoles, cromatografía líquida de alta resolución, análisis de componentes principales, extractos de polifenoles, validación, concentración.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios, producidos principalmente por los hongos de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps*, entre otros (Santillán *et al.*, 2017). Su producción está asociada con el proceso de esporulación del hongo, relacionado estrechamente con las condiciones ambientales y la concentración de nutrientes en el medio (Ledezma, 2004).

La contaminación de granos por micotoxinas puede ocurrir en el campo, durante la cosecha o en los lugares de almacenamiento, los granos afectados comúnmente son el trigo, maíz, arroz, cebada, frijoles, café y cacao. Por lo tanto, el control de la presencia de micotoxinas durante el cultivo, poscosecha y almacenamiento de granos es importante, ya que la ingesta de granos contaminados puede resultar en enfermedades agudas. Este es el caso de las aflatoxinas consideradas como agentes cancerígenos y mutagénicos, asociados con cáncer y daño hepático en humanos y animales (Aasa *et al.*, 2022).

Uno de los principales objetivos de la industria agrícola y alimentaria es reducir la contaminación de alimentos por micotoxinas, ya que se espera un aumento en el consumo de granos en los siguientes años y de ahí la importancia de asegurar la inocuidad de estos alimentos (OECD-FAO, 2018). Es en este punto en el que los polifenoles se vuelven un objeto de estudio y adquieren relevancia en la industria de alimentos, pues debido a sus propiedades antioxidantes son capaces de tener un efecto antimicrobiano y antimicotoxigénico.

El empleo de nuevos métodos para aprovechar el potencial antifúngico de los polifenoles en alimentos sin comprometer su calidad es importante, ya que algunos resultados de investigaciones han llegado a la conclusión de que, para tener algún efecto positivo, es necesario emplear grandes cantidades de extractos de polifenoles de las plantas. Sin embargo, esto puede generar que se altere la aceptabilidad sensorial de los granos (Samapundo *et al.*, 2007).

1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los polifenoles son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes, tanto en la industria médica como en la farmacéutica y la alimentaria. Su capacidad antioxidante proviene de su estructura química al poseer anillos fenólicos que se unen a uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se dividen en varias clases de acuerdo con esa estructura química (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

En las plantas los polifenoles cumplen funciones en el metabolismo secundario, lo que da características como el olor, sabor, reproducción y también funciones protectoras contra depredadores y el estrés fotosintético (Alvarado, 2015). Investigaciones en la industria médica como estudios *in vitro*, intervenciones en humanos y en animales indican que, gracias a estos efectos antioxidantes de los polifenoles se ha logrado la inhibición de crecimiento de tumores, se han prevenido daños a nivel celular y subcelular, activación del sistema de eliminación de sustancias a nivel hepático y bloqueo de rutas metabólicas que puedan ocasionar cáncer (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

En el caso de la industria agroalimentaria estudios demuestran que las concentraciones totales de polifenoles pueden rondar los 92-133 mg/L en pitahaya (Esquivel *et al.*, 2007), los 165-23 mg/L en marañón (Marc *et al.*, 2012) y entre 5030-9040 mg/L en palma aceitera (Neo *et al.*, 2010). En un estudio elaborado por Zabka y Pavela (2013) los autores probaron la eficacia antifúngica de 21 componentes fenólicos de aceites esenciales y sustancias vegetales para inhibir el crecimiento de hongos como *Fusarium spp*, *Penicillium spp* y *Aspergillus spp*.

El presente estudio se enmarca en el proyecto de investigación C1-453 titulado *Desarrollo de nanopartículas acarreadoras de polifenoles naturales para controlar la contaminación de granos por micotoxinas* que se desarrolla en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (Cigras). En el marco de ese proyecto, esta tesis determinó el perfil de polifenoles con potencial antifúngico

presentes en los frutos de seis plantas nativas de Costa Rica, los cuales son palma aceitera (*Elaeis guineensis*), marañón (*Anacardium occidentale* L.), nance (*Byrsonima crassifolia*), guanábana (*Annona Muricata*), jocote (*Spondias purpurea* L.) y pitahaya roja (*Hylocereus costaricensis*).

Se escogieron estos frutos porque existen investigaciones en donde se reporta la presencia de polifenoles (Schweiggert *et al.*, 2016; Irías Mata *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2014; Engels *et al.*, 2012; Esquivel *et al.*, 2007; Neo *et al.*, 2010). No obstante, estas investigaciones no se enfocaron solo en el análisis de polifenoles, sino que también de flavonoides, carotenoides y antocianinas, por lo que en algunos de estos estudios el análisis de polifenoles se enfocó en determinar la capacidad antioxidante e identificar algunos polifenoles que según la literatura predominan.

Además, en el caso del marañón y de la pitahaya se analizó el jugo de la fruta y en el caso del jocote se usó la cáscara. En esta tesis se usó el mesocarpio de los frutos a excepción del marañón que se analizó el pedúnculo (falso fruto). Asimismo, es un estudio del perfil empleando alrededor de 19 estándares de polifenoles para determinar la predominancia de estos en cada fruto. De esta forma, generó conocimiento nuevo a la comunidad científica sobre el perfil de polifenoles presente principalmente en la cáscara y mesocarpio de los frutos en estudio.

Con base en lo anterior, algunos de los polifenoles que se caracterizaron son: ácido cafeico, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, ácido o-coumárico, ácido protocatecuico, epigallocatequina, quercetina, ramnetina, ácido siríngico, ácido elágico, ácido vanílico, naringenina, transresveratrol, kaempferol, ácido 5-cafeolquínico, ácido clorogénico y rutina. Para identificar y cuantificar estos compuestos se utilizó la técnica instrumental de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), pues es una técnica de alta eficiencia y sensibilidad, ya que la concentración de estos compuestos ronda los µg/ml e incluso trazas, por lo que se requiere de tecnologías modernas para su análisis.

Asimismo, se aplicó la misma metodología de extracción de polifenoles a los seis frutos en estudio, con base en el análisis de polifenoles en maíz (Lux *et al.*, 2020). Esta metodología se validó en el presente estudio para comprobar que cumple con los requisitos mínimos de desempeño para que se emplee para el análisis de estos compuestos en estas nuevas matrices. Este estudio brinda información sobre un mismo método, no utilizado previamente para el análisis de polifenoles en estos frutos.

El aporte de los resultados de esta tesis sirve como base para las siguientes etapas del proyecto sobre la encapsulación de polifenoles en nanopartículas poliméricas para reducir la contaminación de granos por micotoxinas.

1.3. ANTECEDENTES

Existen diversos estudios en el ámbito internacional que han reportado la presencia de polifenoles en frutos de plantas no tradicionales como el nance, el marañón, el jocote, la palma aceitera, la guanábana y la pitahaya roja. De igual manera, se ha reportado el efecto antifúngico de estos metabolitos secundarios como se ve a continuación.

En el caso de la pitahaya roja (*Hylocereus costaricensis*), un estudio realizado en Alemania por Esquivel *et al.* (2007), determinó que, las concentraciones de polifenoles totales que se obtienen rondaron los 92-133 mg/L, cuantificados por espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis) usando el método de Folin-Ciocalteu. Se investigó por primera vez el perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC al identificar ácido gálico, tirosina y acetilcumarina. La capacidad antioxidante provenía principalmente del contenido de betalaínas y de los fenoles mencionados (Esquivel *et al.*, 2007).

En el caso de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*), se encuentra el estudio que se lleva a cabo en Malasia por Neo *et al.* (2010), el cual reportó una concentración total de polifenoles con capacidad antioxidante o antimicrobiana de 5030-9040 mg/L, analizada con el método de Folin-Ciocalteu. Los ácidos fenólicos que se identifican por medio de cromatografía líquida de alta resolución

acoplada a masas (HPLC-MS/MS) con mayor concentración fueron el ácido *p*-hidroxibenzoico con 376 µg/g peso en seco (DW por sus siglas en inglés), el ácido *p*-cumárico 55 µg/g DW y el ácido ferúlico con 114 µg/g DW (Neo *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Maldini *et al.* (2011), en Italia, lograron aislar 8 compuestos fenólicos conocidos como ácido 5-O-galoilquínico, ácido 3-O-galoilquínico, 3,4-di-O-galoilquínico, ácido, ácido 3,5-di-O-galoilquínico, ácido 3,4,5-tri-O-galoilquínico, (+)-epicatequina-3-galato junto con (+)-catequina y (+)-epicatequina en el extracto metanólico de la corteza del fruto del nance (*Byrsonima crassifolia*). El análisis se llevó a cabo mediante el método de HPLC-MS/MS y se determinó que la corteza de este fruto es una fuente rica en compuestos fenólicos, particularmente compuestos derivados de galoilo (Maldini *et al.*, 2011).

En un estudio realizado en Costa de Marfil al fruto marañón (*Anacardium occidentale L*), de dos variedades, rojas y amarillas, se determinó el contenido total de fenoles, flavonoides y antocianinas por espectroscopía ultravioleta-visible y la concentración individual de cada polifenol por HPLC. El contenido fenólico total de las variedades rojas y amarillas se encontró entre 23 y 165 mg/L analizadas por el método de Folin-Ciocalteu. Cabe mencionar que para este análisis se usó el jugo de la fruta a partir del mesocarpio (Marc *et al.*, 2012).

En el primer reporte publicado referente a la composición fenólica del jocote (*Spondias purpurea L*), se menciona que estos compuestos fueron caracterizados por medio de la técnica analítica HPLC con detección por arreglo de diodos y detección de LC-MS/MS. El estudio se realizó en Canadá y se identificaron alrededor de 21 compuestos fenólicos en las muestras del exocarpio liofilizado del jocote. Algunos de estos compuestos fueron: ácido gálico, quercetina y sus derivados, además de kaempferol y sus derivados (Engels *et al.*, 2012).

Seguidamente, se encuentra la investigación de Jiménez *et al.* (2014), efectuada en Alemania, que fue el primer estudio sobre la identificación de compuestos fenólicos en la pulpa de guanábana (*Annona muricata*) utilizando LC-

MS/MS. Los autores lograron identificar alrededor de 16 compuestos fenólicos que se basan en patrones de fragmentación, donde los compuestos que predominaron fueron derivados del ácido cinámico y ácido *p*-coumárico (Jiménez *et al.*, 2014).

Existen diversos trabajos que reportan la inhibición del crecimiento microbiano utilizando extractos de polifenoles presentes en plantas. Este es el caso de un estudio realizado en República Checa, el cual reportó que, concentraciones alrededor de los 1000 mg/L se han empleado para la inhibición de hasta un 100 % en el crecimiento de hongos como *Fusarium spp*, *Penicillium spp* y *Aspergillus spp*. Además, se probó la eficacia antifúngica de 21 componentes fenólicos de aceites esenciales y sustancias vegetales contra estos hongos filamentosos, el timol y el carvacrol son los más efectivos (Zabka y Pavela, 2013).

En un estudio realizado por Barral *et al.* (2017), se inoculó directamente *F. ananatum* en frutos de piña para monitorear el crecimiento de manchas negras. Asimismo, evaluaron la actividad antifúngica de compuestos fenólicos y ácido ascórbico frente al crecimiento micelial de *F. ananatum*. El ácido *p*-cumárico exhibió una inhibición total del crecimiento micelial a 1000 µg g⁻¹. El ácido ferúlico inhibió 64 % del crecimiento micelial a una concentración de 1000 µg g⁻¹. El ácido cafeoilquínico, el ácido sinápico y el ácido ascórbico también mostraron una actividad antifúngica.

Existen otros estudios que han reportado esta actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de las plantas atribuido a la presencia de polifenoles. Como lo indican Carvalho *et al.* (2011), en su estudio realizado en Brasil para identificar las especies de plantas con propiedades antifúngicas contra *Alternaria alternata* el agente causal de la mancha marrón. Se obtuvo que, de 105 especies de plantas, el extracto de huilco redujo la enfermedad en frutas de mandarina a los niveles que se obtienen con fungicidas comerciales (Carvalho *et al.*, 2011).

En Costa Rica se realizan estudios sobre la identificación y cuantificación de polifenoles, así como de su actividad antioxidante y actividad citotóxica,

utilizando como fuente de estos compuestos frutos de anona, ciruelo y en jugo de huiscoyol. En el estudio efectuado en frutos de anona y ciruelo, se caracterizaron compuestos como flavonas, diterpenos oxidados, ácidos polihidroxiados (Navarro-Hoyos *et al.*, 2014) y en el caso del estudio en jugo de huiscoyol se determinó el efecto del procesamiento sobre el contenido de compuestos bioactivos, capacidad antioxidante y perfil de compuestos polifenólicos. Esto da como resultado la presencia de componentes polifenólicos como los taninos hidrolizables y condensados, procianidinas, derivados de catequinas y galocatequinas, además de derivados mono- y diglicosidados de kaempferol, así como antocianinas (Cortés, 2019).

En conclusión, la mayoría de la información que se encuentra en donde se reporta la presencia de polifenoles en los frutos de palma aceitera, marañón, nance, guanábana, jocote y pitahaya roja son investigaciones que tienen en común que se evalúa primero el contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu, después se identifican, caracterizan o cuantifican por técnicas de HPLC/MS-MS con base en el patrón de fragmentación de los iones que presentan los estándares de polifenoles, así que son técnicas empleadas comúnmente para determinar el perfil de polifenoles. Además, se sugiere que los polifenoles presentes en estos frutos pueden presentar potencial antifúngico, con base en los estudios en donde evalúan la capacidad de inhibición del crecimiento de hongos empleando polifenoles.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Determinar el perfil de polifenoles en frutos de plantas de guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera nativas de Costa Rica con potencial antifúngico.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Implementar una metodología para el pretratamiento de extracción de los frutos de guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera de plantas nativas de Costa Rica.
2. Verificar la metodología analítica para el análisis de polifenoles mediante la evaluación de los parámetros de linealidad, precisión, veracidad y recuperación de matriz.
3. Implementar la extracción de los polifenoles solubles e insolubles de los frutos de guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera que se basa en el protocolo de extracción de Lux *et al.* (2020).
4. Identificar mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los polifenoles presentes en guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera de plantas nativas de Costa Rica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES

Los polifenoles son metabolitos secundarios producidos por las plantas. Entre estos metabolitos secundarios destacan los terpenos, glicósidos, alcaloides y los compuestos fenólicos. Estos últimos incluyen los flavonoides, fenilpropanoides, cumarinas, ligninas y taninos (Ávalos y Pérez, 2009). Los ácidos fenólicos son los principales polifenoles producidos por las plantas y estos metabolitos secundarios se relacionan con el sistema de defensa ante patógenos (Mandal *et al.*, 2010).

Los ácidos fenólicos se caracterizan por tener anillos aromáticos hidroxilados. Mandal *et al.* (2010), mencionan que la vía del ácido siquímico está involucrada en la síntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas, hongos y bacterias y en el caso de la vía del ácido manólico tiene menos importancia en la formación de ácidos fenólicos en plantas superiores en comparación con hongos y bacterias. En la Figura 1 se muestra la ruta de síntesis de estos metabolitos secundarios en plantas.

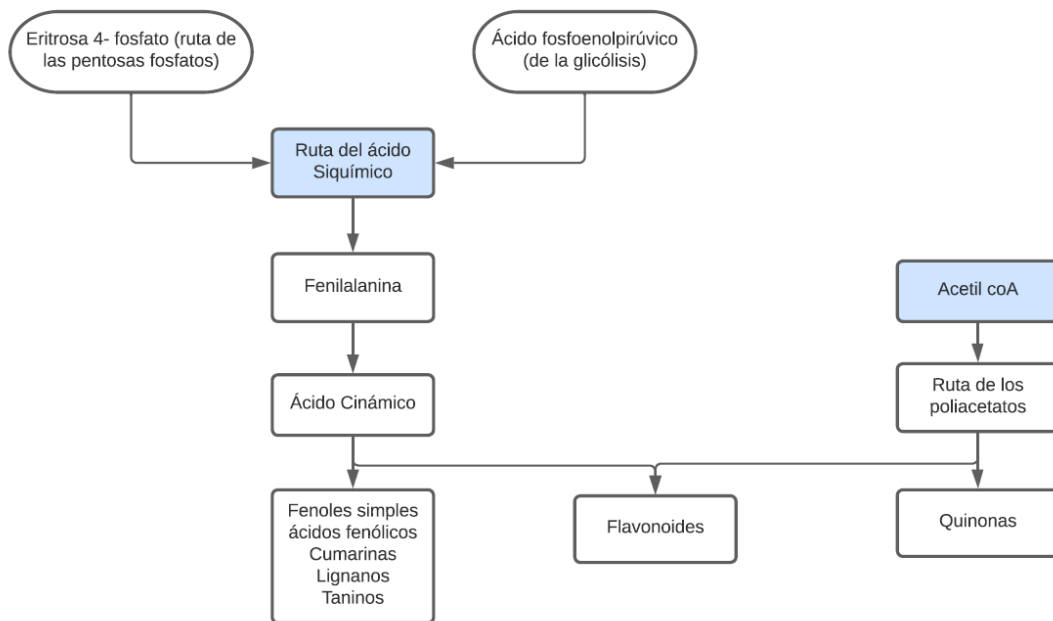


Figura 1. Ruta de síntesis de compuestos fenólicos en plantas

Fuente: Adaptado de Ávalos y Pérez (2009).

En resumen, el ácido siquímico es el compuesto base para la biosíntesis de una gran cantidad de metabolitos secundarios. A partir de este se forma el aminoácido fenilalanina (como se puede observar en la Figura 1) y desde este los otros compuestos aromáticos más complejos.

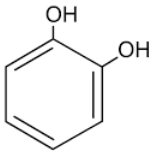
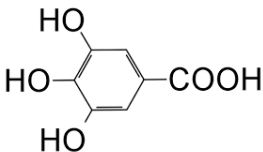
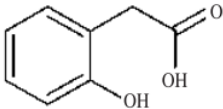
Asimismo, estos metabolitos desempeñan distintas funciones y no se encuentran en todas las plantas. Es decir, que según género, especie o familia de plantas producirán diferentes tipos de metabolitos secundarios que le brindan propiedades ecológicas específicas como pigmentación y funciones protectoras ante patógenos actuando como pesticidas naturales. Esta función en el mecanismo de defensa de la planta convierte a los polifenoles en objeto de estudio de suma importancia, además de poseer propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas (Cabrera-Soto *et al.*, 2009).

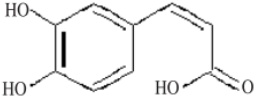
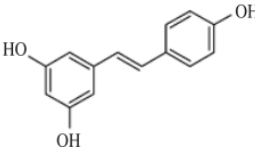
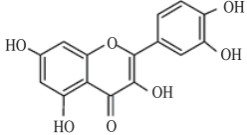
Las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de los polifenoles se basan en la capacidad de estos compuestos de inhibir funciones vitales como la respiración, el crecimiento o la reproducción de los microorganismos mediante

mecanismos de oxidación de enzimas específicas (Martín Gordo, 2018). De la misma forma, la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos proviene de su capacidad para secuestrar radicales libres debido a los anillos aromáticos y los grupos hidroxilos de su estructura (Zamudio Cuevas, 2011).

Existen diversas clases y subclases de polifenoles, los principales grupos de compuestos fenólicos son: los ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos y alcoholes fenólicos (Quiñones *et al.*, 2012). En el Cuadro 1, es posible observar algunos de estos principales compuestos. Según cómo aumente el número de anillos así aumentará la complejidad de su estructura.

Cuadro 1. Clasificación general de polifenoles

Clase	Estructura	Ejemplo
Fenol simple	C6	Catecol 
Ácidos hidroxibenzoicos	C6-C1	Ácido gálico 
Ácidos fenilacético	C6-C2	Ácido 2-hidroxifenilacético 
Ácido hidroxicinámico	C6-C3	Ácido cafeico

		
Estilbenos	C6-C2-C6	Resveratrol 
Flavonoides	C6-C3-C6	Quercetina 

Fuente: Adaptado de Mercado-Mercado *et al.* (2013).

Los fenoles simples como el fenol, el cresol y timol están presentes en la mayoría de las especies vegetales al igual que los ácidos fenólicos como el vanílico, el *p*-hidroxibenzoico y el ácido gálico. Los taninos se dividen en hidrolizables y condensados, estos últimos también se conocen como antocianinas. Los lignanos son de bajo peso molecular y por lo general tienen un puente de cuatro carbonos mientras que los flavonoides se pueden dividir en flavonas, flavonoles, flavononas, flavonololes, chalconas e Isoflavonoides (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009).

2.2. INFORMACIÓN Y CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LOS FRUTOS

2.2.1. Palma aceitera

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una planta cultivada para la extracción de aceite y existen tres variedades; Duras, Psiferia y Tenera (Technoserve, 2009). Esta especie conocida como palma africana es nativa de las áreas de mayor humedad de África tropical (Forero Hernández *et al.*, 2012).

Pertenece a la familia *Palmaceae*, de la división de fanerógamas del tipo angiosperma, al orden de las palmales y al género *Elaeis* (Technoserve, 2009).

Para este estudio se analiza la variedad Avalanche, que es un híbrido a partir del entrecruzamiento de palmas madres (Duras) entre líneas paternas originarias de Nigeria. Esta variedad se introdujo en Costa Rica en 1979 y en la actualidad se usan de la variedad Psiferia (ASD Costa Rica, 2020).

2.2.2. Marañón

El marañón (*Anacardium occidentale L.*) es nativo de la costa de Brasil y crece en suelos pobres y bajo diversas condiciones climáticas (Marc *et al.*, 2012). En Costa Rica se cultiva desde hace más de 60 años en diferentes cantones como Esparza, Puriscal, Orotina y San Mateo y en la provincia de Guanacaste (Saborío, 2012). El fruto se distingue por sus características de color, tamaño y producción. En el caso de los marañones criollos se diferencian en tres tipos de acuerdo con el color: rojos, amarillo y color salmón. Este fruto pertenece a la familia *Anacardiaceae*, al género *Anacardium* y a la especie *Occidentale* (Cáceres, 2004).

2.2.3. Nance

El nance, (*Byrsonima crassifolia (L.) Kunth*), pertenece a la familia Malpighiaceae y al género *Byrsonima* (Zamora, 2000). Este es un árbol frutal que se cultiva desde el sur de México, pasando por el Pacífico de América Central, hasta Perú y Brasil (Irrias-Mata *et al.*, 2018). En Costa Rica se encuentra en sitios con una estación seca definida.

2.2.4. Guanábana

La guanábana (*Annona muricata L.*), pertenece a la familia *Annonacea* y al género *Annona* (Jiménez *et al.*, 2014). Es originaria de las áreas cálidas de América del Sur y del Norte y ahora distribuida a diferentes regiones de América Central, África Occidental y Asia (Orak *et al.*, 2019). En Costa Rica, las principales plantaciones se encuentran en los cantones de San Carlos, Upala, Guácimo,

Limón, Matina, Siquirres, Garabito, Parrita, Pococí y Pérez Zeledón (Tacán Pérez, 2007).

2.2.5. Jocote

El jocote (*Spondias purpurea* L.), es un fruto tropical de origen Mesoamericano (Venegas, 2005). En Costa Rica se puede encontrar en la Vertiente del Pacífico, desde Guanacaste hasta la Península de Osa y en el Valle Central (Jiménez, 2001). Pertenece a la familia *Anacardiaceae*, al género *Spondias* y a la especie *Purpurea* L (Venegas, 2005).

2.2.6. Pitahaya roja

La pitahaya roja (*Hylocereus costaricensis*), es originaria de regiones tropicales del norte, central y sur de América (Esquivel *et al.*, 2007). Pertenece a la división *Magnoliophyta*, a la clase *Magnoliopsida*, al orden *Caryophyllales*, a la familia *Cactaceae* y al género *Hylocereus*. En las zonas secas es el cactus más común y sus frutos son los que se conocen como pitahayas. En Costa Rica se encuentra distribuida a lo largo del país en la provincia de Guanacaste, en el Pacífico Central, Valle del Tárcoles, Valle de la Candelaria, Acosta, Fila Bustamante, Cerros de Escazú, Valle Central y Valle del Térraba (Morales, 2001).

2.3. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES EN MATRICES VEGETALES

Para la extracción de polifenoles existen diferentes metodologías que varían según la naturaleza química de estos compuestos, principalmente de su polaridad. Se sabe que en las matrices vegetales los fenoles se pueden agrupar en solubles o insolubles. Existen distintas técnicas de extracción como la extracción asistida por ultrasonido, la extracción asistida por microondas y la extracción con fluidos supercríticos, estos métodos proporcionan selectividad y rapidez, pero el uso de técnicas modernas representa costos elevados (Núñez Moreira *et al.*, 2019).

El método tradicional de extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos es una alternativa que es muy empleada. Para esto, se debe escoger el

disolvente adecuado, según la polaridad, por lo general, se usan mezclas acuosas de metanol, etanol o acetona y la extracción debe llevarse a cabo a temperatura ambiente para evitar algún tipo de degradación. Además, se usan otras técnicas de extracción combinadas como el uso de agitadores, *vortex* o baños ultrasónicos, de esta forma, se intensifica el proceso de extracción de los compuestos (Cortés, 2019).

No obstante, antes de aplicar la extracción de los polifenoles se requieren pasos previos para el tratamiento de la muestra, que son fundamentales para eliminar sustancias que pueden interferir. Este es el caso de la palma aceitera cuyo pretratamiento requiere un desaceitado del mesocarpio mediante el método de extracción por Soxhlet. La extracción de grasa por el método de Soxhlet es una técnica de separación sólido-líquido empleada usualmente para la determinación del contenido graso en diferentes tipos de muestra (Valencia, 2018), el cual ayuda a remover la mayor cantidad posible de contenido graso que pueda interferir en la extracción de polifenoles.

En el caso de la guanábana, jocote, nance, marañón y pitahaya roja una alternativa es el empleo de una liofilización. Según Abdelwahed *et al.* (2006), la liofilización consiste en eliminar el agua de una muestra congelada mediante sublimación y desorción al vacío, es decir, esta técnica combina bajas temperaturas y vacío, lo que genera la sublimación del agua congelada. De esta forma, se logra deshidratar la muestra, pero sin dañar los tejidos ni alterar su composición química.

2.4. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLAS

Para el análisis de polifenoles se emplean diferentes metodologías ya sean cualitativas o cuantitativas. Con anterioridad, se mencionó que en la mayoría de los análisis para el contenido fenólico total se emplea la metodología de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en que los polifenoles reaccionan con un reactivo llamado Folin-Ciocalteu, que contiene una mezcla de wolframato sódico

y molibdato sódico y a la hora que reacciona con los polifenoles presentes se forma un complejo de color azul que se puede determinar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 765 nanómetros (nm) (García Martínez *et al.*, 2015). Asimismo, en este método colorímetro, el contenido fenólico total suele expresarse en términos de miligramos (mg) de ácido gálico equivalente (Jurado *et al.*, 2016).

Para la identificación y cuantificación de polifenoles se emplean diferentes métodos, como la resonancia magnética nuclear, cromatografía de gases acoplado a detector de masas y la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de ultravioleta visible con arreglo de diodos o sin arreglo y también acoplado a masas (Martín Gordo, 2018). La cromatografía líquida de alta resolución o presión es una técnica analítica de separación que utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida y el flujo de la fase móvil se pasa a presiones entre los 1500 a 2000 psi hasta un máximo de 4000 psi. Esta separación se logra mediante procesos de partición, adsorción o intercambio iónico según el tipo de fase estacionaria que se utiliza (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2021).

Cuando se emplea esta técnica acoplada a espectrometría de masas se identifican y cuantifican compuestos gracias a la relación masa/carga (m/z) única para cada sustancia (Cocho de Juan, 2008). Lo que la hace una técnica de alta sensibilidad y exactitud, sin embargo, al ser una técnica de última tecnología el costo de estos equipos es elevado, por lo que el empleo de técnicas con un costo menor, pero que proporcionen resultados igual de confiables son vías alternas preferidas, tal es el caso de la detección con arreglos de diodos. Como lo indica Rubio (2009), el detector de arreglos de diodos es un detector sensible y específico que puede brindar un espectro de absorción para cada analito y mucho más económico que la espectrometría de masas.

De la misma forma, los métodos de análisis, ya sea para identificación o cuantificación de compuestos se someten a pruebas para comprobar que los resultados son confiables y que los métodos son aptos para el propósito

requerido. Este proceso se denomina validación de métodos, en el cual se establece mediante pruebas de laboratorio que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2021).

Algunas de las características típicas que se utilizan en la validación de métodos analíticos son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango y robustez. Como establece la International Conference on Harmonisation (ICH) en su guía para la validación de métodos analíticos (ICH, 2005), la evaluación de todos o solo algunos de estos parámetros depende del tipo de categoría a la que pertenezca el método analítico. Por ejemplo, si es un método analítico para determinación de principio activo, si son procedimientos para pruebas límite o de características de desempeño o métodos para pruebas de identificación.

En el marco de esta investigación los parámetros de desempeño que se evaluaron fueron linealidad, precisión, veracidad y recuperación de matriz, límite de detección y límite de cuantificación. La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad de este para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, es una relación entre la concentración de la muestra y la medición del ensayo (Castillo Aguilar y González Hernández, 1996).

De acuerdo con el U.S. Food and Drugs Administration (FDA) la evaluación de la exactitud o veracidad, precisión y recuperación es fundamental para determinar si el método es adecuado para analizar las muestras en estudio. En la exactitud se evalúa el grado de cercanía entre el valor determinado al nominal, mientras que en la precisión se determina el grado de dispersión entre una serie de mediciones repetitivas de esta muestra homogénea en condiciones prescritas. La recuperación de matriz se refiere a la eficiencia de la extracción de un procedimiento analítico, porque se analiza como porcentaje la cantidad conocida de un analito transportado a través de la extracción de la muestra tomando en cuenta los pasos del procesamiento del método (FDA, 2018).

De la misma forma, el análisis estadístico de los datos es una herramienta que complementa las investigaciones analíticas. Bauce (2000) menciona al respecto que, durante las investigaciones se busca establecer las causas a cierto fenómeno, lo que crea una relación de causa y efecto, que involucra variables dependientes e independientes.

Asimismo, las investigaciones que involucran análisis químicos están sujetas a errores de diferentes tipos, como los errores sistemáticos y aleatorios. Los primeros involucran errores instrumentales, errores por parte del analista y errores provenientes del método de análisis, mientras que en el caso del segundo tipo son errores cuya causa proviene del azar. Miller y Miller (2002) afirman que no hay análisis cuantitativos que no involucren la estimación del error inherente a estos y que para revelar su presencia es necesario el análisis que involucre medidas repetitivas. El análisis de estas medidas repetitivas se puede llevar a cabo mediante elementos estadísticos fundamentales como el promedio, la desviación estándar, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, error relativo e intervalo de confianza, entre otros.

El promedio es un valor numérico que se obtiene al sumar una serie de medidas repetitivas entre el número de resultados individuales de la serie, de acuerdo con Fernández (2001), se expresa mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del promedio

$$\bar{x} = \frac{X1 + X2 + X3 + \dots + Xn}{n}$$

Donde \bar{x} es el promedio de los resultados. X cada uno de los valores individuales y n la cantidad de muestras analizadas.

En el caso de la determinación de la exactitud esta se expresa en términos de error relativo, es el cociente entre el valor obtenido y el valor verdadero dividido entre el valor verdadero, expresada por la Ecuación 2, según Skoog *et al.* (2014):

Ecuación 2. Fórmula para el cálculo del error relativo

$$Er = \frac{X_i - X_t}{X_t} \times 100$$

Donde:

Er: Error relativo.

Xi: Valor obtenido.

Xt: Valor verdadero.

Seguidamente, de acuerdo con Araya (2004), la desviación estándar representa la variabilidad de los datos muestrales y se expresa mediante la Ecuación 3.

Ecuación 3. Fórmula para el cálculo de la desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

S: Desviación estándar.

Xi: valor individual.

\bar{x} : Valor promedio.

n: El número de muestras.

La desviación estándar relativa (RSD) y el coeficiente de variación son otros parámetros de variabilidad. El primero es la desviación estándar dividida entre el promedio y el segundo es el RSD expresado en porcentaje (RSD*100) (Miller y Miller, 2002).

Por último, el intervalo de confianza es un límite alrededor del valor promedio obtenido experimentalmente. Estos límites indican los valores en donde

se puede encontrar el valor promedio verdadero con cierta probabilidad, de acuerdo con Fernández (2001) se expresa mediante la Ecuación 4.

Ecuación 4. Fórmula para el cálculo del intervalo de confianza

$$\bar{x} \pm \frac{S}{\sqrt{n}} * t$$

En donde, S es la desviación estándar del conjunto de datos, n el número de muestras y t es el parámetro estadístico de la t de Student. Todos estos parámetros describen la precisión y exactitud de un conjunto de datos que se obtienen en una investigación.

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. ORIGEN Y PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras sometidas al estudio provienen de diferentes zonas del país y se recolectaron por personal del Cigras mediante un muestreo aleatorio simple durante el periodo de cosecha de cada fruto. A continuación, se describe el lugar, ubicación y la fecha de muestreo para cada fruto:

- Palma aceitera: Lugar de muestreo, Damas de Quepos, (N 9.494959100911517, W -84.21454548017324). Fecha de muestreo: 9 de febrero de 2021. Variedad híbrida denominada *Avalanche*.
- Marañón: Lugar de muestreo: Mastate de Orotina (N 10 9°54'47.6", W 84°32'27.5"). Fecha de muestreo: 27 de febrero de 2021. De color anaranjadas y amarillas, variedad desconocida.
- Guanábana: Lugar de muestro: Jadín, Pococí, Limón (N 10.392861501038345, W -83.7870812528987). Fecha de muestreo: 19 de mayo de 2021. Variedad desconocida.
- Nance: Lugar de muestreo: Mastate de Orotina (N 10 9°54'47.6", W 84°32'27.5"). Fecha de muestreo: 22 de mayo y 5 de junio de 2021. Nance amarillo, variedad desconocida.
- Pitahaya roja: Lugar de muestreo: El salto, Liberia (N 10°35.033", W 085°22.892"). Fecha de muestreo: 4 de junio de 2021. Genotipo *Orejona*.
- Jocote: Lugar de muestreo: Chirracá de San Ignacio de Acosta, San José (N 9°49'22", W 84°10'60"). Fecha de muestreo: 01 de agosto de 2021. Variedad desconocida.

Se colectaron frutos de tamaño mediano en estado fisiológico de madurez para cosecha. Todas las muestras recolectadas se llevaron al laboratorio y se almacenaron en congelación a -40 °C enteras. Las muestras provienen de 5

árboles diferentes escogidos al azar (5 lotes), estos 5 lotes por fruto se analizaron en 4 réplicas, las cuales se subdividieron en 4 réplicas para determinar polifenoles en fracción soluble y 4 réplicas para fracción insoluble para un total de 40 submuestras por fruto y 240 submuestras en total. Antes de la extracción de los polifenoles se realizó un pretratamiento a cada fruto, el cual dependió de la naturaleza de estos. Una vez tratados, se resguardaron en una cámara de refrigeración a una temperatura aproximada de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa de $55\% \pm 5\%$.

El pretratamiento consistió en lo siguiente: para la palma aceitera se realizó primero un desaceitado del mesocarpio con el método de extracción del Soxhlet (Neo *et al.*, 2010). Para esto, se peló manualmente el fruto, se cortó en pequeños trozos hasta obtener una cantidad de muestra fresca entre los 5 a 10 g y se sometió a la extracción con hexano por seis horas a una temperatura alrededor de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el sistema Soxhlet. Después, se secó en una mufla por cinco horas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se molió. El polvo medio-fino se guardó en refrigeración en las condiciones indicadas.

Para los demás frutos se empleó la técnica de liofilización (Schweiggert *et al.*, 2016; Irías Mata *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2014; Engels *et al.*, 2012; Esquivel *et al.*, 2007). En el caso del marañón se procesó el falso fruto, es decir, el pedúnculo, mientras que para las muestras de nance, guanábana, jocote y pitahaya roja se procesó, tanto la cáscara como el mesocarpio de cada fruto. Cada uno de los frutos se cortó en pequeños trozos, se colocaron en el equipo de liofilización, para su consecuente deshidratación por cuatro días. La muestra liofilizada se molió hasta obtener un polvo fino y seco homogenizado debidamente y se guardó bajo refrigeración hasta su análisis posterior.

3.2. VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La verificación de la metodología de análisis de polifenoles se realizó en términos de linealidad, precisión (repetibilidad o precisión intermedia), veracidad y recuperación de la matriz, según lo establecido por la Guía de validación de

métodos bioanalíticos de la FDA (Food and Drug Administration) del 2018, utilizando estándares de referencia de polifenoles. A continuación, se detalla cómo se llevó a cabo y los criterios de aceptación de cada parámetro.

3.2.1. Linealidad

Se estimó a partir de 2 curvas de calibración con 10 niveles de concentración. La primera curva se analizó en un rango de 1 a 45 µg/ml y estaba compuesta por 17 polifenoles: ácido cafeico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, epigallocatequina, ramnetina, ácido síringico, ácido elágico, ácido vanílico, naringenina, kaempferol, ácido 5-cafeolquínico, ácido clorogénico, ácido o-coumárico, transresveratrol y rutina. La curva 2 estaba compuesta por 2 estándares de polifenoles; quercetina y ácido gálico en un rango entre 4 a 180 µg/ml.

3.2.1.1. Criterio de aceptación

Los patrones de la curva debían estar en un $\pm 15\%$ de concentraciones nominales (teóricas), excepto en LLOQ (límite de detección más bajo) donde el calibrador debía ser $\pm 20\%$ de las concentraciones nominales en cada ejecución de validación. El 75% y un mínimo de 6 patrones debieron cumplir con el anterior criterio, en este caso al menos 8 de los 10 patrones de la curva.

3.2.2. Precisión (repetibilidad o precisión intermedia)

Para validar estos parámetros se usaron los resultados de las curvas de calibración efectuadas en la sección 3.2.1. Se realizaron 3 medidas independientes de la curva de calibración de la prueba de linealidad, con 3 niveles de control por medida durante 3 días diferentes. Para los polifenoles de la curva 1 las concentraciones por nivel fueron: nivel bajo 10 µg/ml, medio 25 µg/ml y alto 40 µg/ml. Para los polifenoles de la curva 2 las concentraciones por nivel fueron: bajo 40 µg/ml, medio 100 µg/ml y alto 160 µg/ml.

3.2.2.1. Criterio de aceptación

Como máximo se aceptó un $\pm 15\%$ de coeficiente de variación (CV), excepto en el LLOQ, en donde podía ser de $\pm 20\%$ CV.

3.2.3. Veracidad y recuperación

Para verificar los parámetros de exactitud y recuperación, se determinaron porcentajes de recuperación. Se usaron muestras de guanábana y jocote enriquecidas con estándar del polifenol de ácido orto-coumárico a nivel bajo ($10\ \mu\text{g/ml}$), medio ($80\ \mu\text{g/ml}$) y alto ($160\ \mu\text{g/ml}$) y se compararon contra blancos de las muestras sin enriquecer después de la extracción. Posteriormente, se realizó la extracción y análisis como se indica más adelante.

3.2.3.1. Criterio de aceptación

La exactitud se aceptó como máximo un $\pm 15\%$ CV de las concentraciones nominales; excepto en el LLOQ, en donde podía ser de $\pm 20\%$ CV. Las recuperaciones podían encontrarse entre 83% - 115% y debían ser consistentes y reproducibles ($\pm 15\%$ CV).

3.3. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

Para la extracción de los polifenoles se implementó un único protocolo para los seis frutos de las plantas de interés, con base en Lux *et al.* (2020). En la Figura 2 se muestra un ejemplo del procedimiento de extracción en palma aceitera, el cual se implementó para los demás frutos.

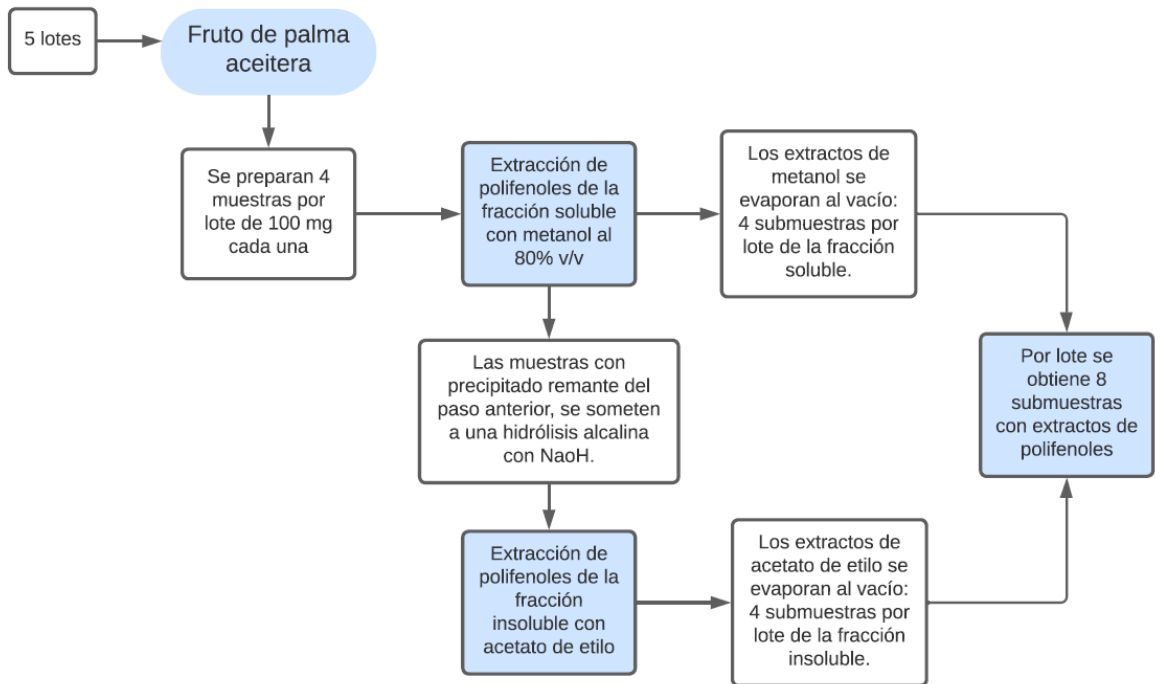


Figura 2. Flujo del procedimiento de extracción de polifenoles usando el fruto de palma aceitera como ejemplo

Fuente: Elaboración propia con base en el protocolo de extracción de Lux *et al.* (2020).

3.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES

El método de identificación y cuantificación de polifenoles es un protocolo implementado por el Cigras validado debidamente para el análisis de polifenoles que se basa en Fratianni *et al.* (2014). Una vez que se obtienen los polifenoles en los extractos solubles e insolubles después de la evaporación a sequedad, se resuspendieron en 500 µl de una mezcla de metanol: agua (1:1) para todos los frutos, excepto para los extractos de la palma que se disolvieron en 500 µl de metanol grado HPLC.

El extracto disuelto se homogeneizó en baño ultrasónico y se filtró a través de un filtro de 0.20 µm de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) marca Agilent de Estados Unidos (USA) y se colectó en viales ámbar para su consecuente inyección en el equipo HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 de Massachusetts

USA. En el Cuadro 2, se pueden observar las condiciones de análisis del sistema cromatográfico y en el Cuadro 3, la gradiente de la fase móvil que se empleó.

Cuadro 2. Condiciones de análisis del sistema cromatográfico

Elemento	Condiciones de análisis
Equipo	HPLC Thermo Scientific Ultimate 3000
Software	Chromeleon 7.3
Detector	DAD rango de escaneo de 210-800 nm.
Columna	Waters Acquity C18 (100 x 2,1 mm; 1.7 µm).
Temperatura de la columna	30 °C
Flujo	0.250 ml/min.
Volumen de inyección	5 µl.
Tiempo de corrida	35 minutos.
Diluyente	Agua y Metanol 1:1(v/v)
Disolución A	Disolución de ácido acético 7.5 mM en agua.
Disolución B	Acetonitrilo 100 %

Fuente: Elaboración propia con base en datos del Cigras (2021).

Cuadro 3. Orden de elución de la gradiente de la fase móvil

Tiempo (min)	Disolución A (%)	Disolución B (%)
0	95	5
3.0	95	5
6.0	80	20
9.0	80	20

12.0	70	30
15.0	70	30
20.0	50	50
25.0	0	100
27.0	0	100
30.0	95	5
35.0	95	5

Fuente: Elaboración propia con base en datos del Cigras (2021).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante una estadística descriptiva con la que se calcularon los parámetros básicos de promedio (\bar{x}), desviación (s), desviación estándar relativa (RSD) e intervalo de confianza. Este último a un nivel de confianza del 95 % y un nivel de significancia del 0.05, tomando en cuenta que los datos provienen de una distribución normal. Para el descarte de resultados anómalos se empleó el método de Grubbs a un nivel de confianza del 95 % y un nivel de significancia del 0.05. Se emplearon hojas de cálculo de Microsoft Excel, además del uso del *software* R para el análisis comparativo del perfil de polifenoles de los frutos.

4. RESULTADOS

4.1. PRETRATAMIENTO DE LOS FRUTOS

Las muestras de la palma aceitera se trataron con un proceso de extracción de Soxhlet empleando hexano como solvente y durante un periodo promedio de seis horas para eliminar el aceite y otras impurezas que pudieran interferir en la etapa de extracción de polifenoles, después fue secada y molida. En el caso de los frutos de marañón, nance, guanábana, jocote y pitahaya roja, fueron liofilizadas para prevenir la degradación de los polifenoles. A partir de esto se logró obtener un polvo fino homogéneo y representativo de los cinco lotes de cada fruto para facilitar la manipulación de la muestra en la etapa de extracción de polifenoles (Anexo 1).

En la Figura 3 (A) se muestra un ejemplo del tratamiento de liofilización para el fruto de marañón y en la Figura 3 (B) el método de extracción de Soxhlet aplicado al fruto de palma aceitera.

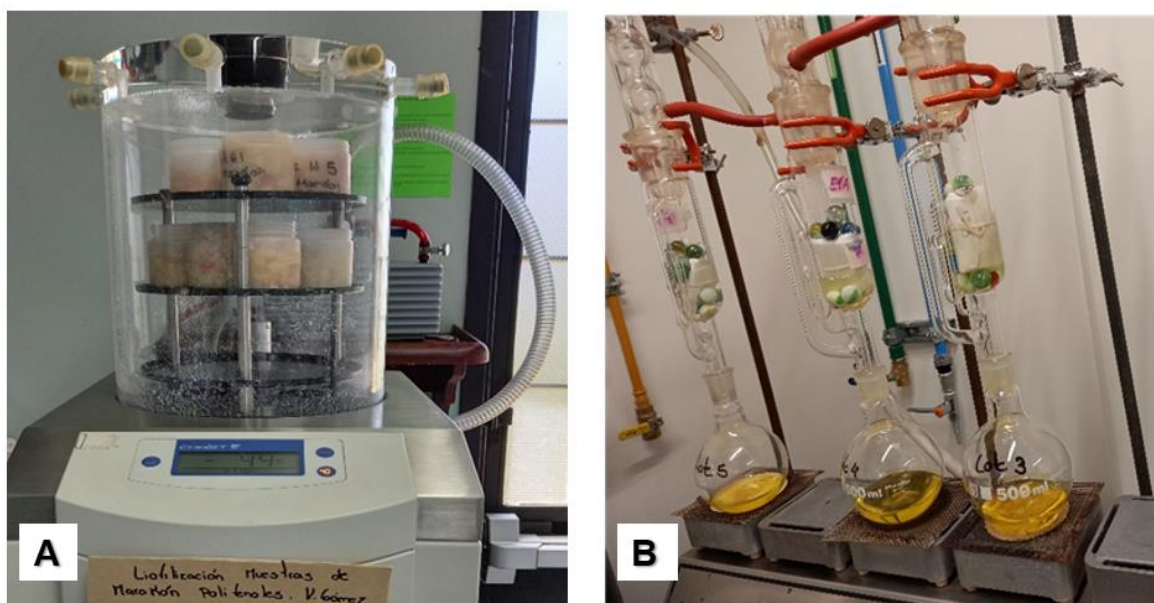


Figura 3. Ejemplo del uso de la técnica de liofilizado para el pretratamiento en el fruto de marañón (A) y del proceso de extracción de grasas por Soxhlet en el fruto de palma aceitera (B)

4.2. VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.2.1. Verificación de la linealidad

Para el análisis de las curvas de calibración, la relación concentración-respuesta se analizó a partir del modelo de regresión más simple, como lo indica la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA. Por lo tanto, el criterio de aceptación estuvo sujeto al cálculo del porcentaje de error relativo entre las concentraciones nominales y las teóricas. En el Cuadro 4 se presenta la ecuación de la curva, el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación lineal (r) y el rango del porcentaje de error relativo obtenido para los 10 puntos de calibración de las curvas.

Cuadro 4. Resultados de linealidad de las curvas de calibración

Estándar de polifenol	Ecuación de la curva	R ²	R	Rango del porcentaje de error relativo
Ácido 4-hidroxibenzoico	$Y = 0,4116x - 0,2748$	0,9996	0,9998	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-2,7 a 0,9) %
Ácido 5-o-cafeoilquinico	$Y = 0,3697x - 0,5839$	0,9935	0,9967	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-14,8 a 6,2) %
Ácido cafeico	$Y = 0,3244x + 0,0432$	0,9978	0,9989	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-4,4 a 6,7) %
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	$Y = 0,1697x - 0,1287$	0,9973	0,9986	8 de los 10 patrones cumplen en un rango de (-6,6 a 6,9) %
Ácido ferúlico/Ácido elágico	$Y = 0,5859x - 1,203$	0,9981	0,999	8 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-2,5 a 1,5) %
Ácido gálico	$Y = 0,3906x - 4,9005$	0,9934	0,9967	8 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-10,9 a 2,2) %.
Ácido p-coumárico	$Y = 1,0325x - 0,8217$	0,9995	0,9997	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-2,3 a 1,1) %
Ácido protocatecuico	$Y = 0,173x - 0,3758$	0,9958	0,9979	9 de los 10 patrones cumplen,

				en un rango de (-7,4 a 14,8) %
Ácido siríngico	$Y=0,8711x-1,3372$	0,9978	0,9989	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-5,8 a 6,2) %
Ácido-o-coumárico	$Y=1,8072x-1,1666$	0,9997	0,9998	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-1,8 a 0,8) %
Epigallocatequina	$Y=0,2641x-0,2585$	0,9981	0,999	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-4,4 a 3,3) %
Kaempferol	$Y=0,2525x-0,2625$	0,9988	0,9994	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-5,5 a 5,1) %
Naringenina	$Y=0,6376x-0,169$	0,9996	0,9998	10 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-2,9 a 12,9) %
Quercetina	$Y=0,2149x-1,3534$	0,9974	0,9987	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-6,1 a 6,9) %
Ramnetina	$Y=0,2064x-0,1095$	0,9986	0,9992	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-14,5 a 4,6) %
Rutina	$Y=0,1405x-0,0095$	0,9988	0,9994	10 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-3,6 a 11,4) %

Transresveratrol	$Y=1,0062x-1,0147$	0,999	0,9995	9 de los 10 patrones cumplen, en un rango de (-2,6 a 3,1) %
------------------	--------------------	-------	--------	-------------------------------------------------------------

Con respecto a la prueba de linealidad para las 19 curvas de los estándares de polifenoles, para la mayoría de los casos el patrón menos concentrado fue el que no cumplió con un valor menor al 15 % de error relativo. En los demás patrones al menos 9 de los puntos calibrados cumplen con el criterio y solo en la curva de ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido ferúlico/ácido elágico y ácido gálico solo 8 de los patrones están dentro del criterio de aceptación, pero cumplen con la especificación total de que el 75 % de los puntos calibrados deben estar dentro del criterio. Además, todas las curvas presentaron un coeficiente de correlación lineal superior a 0,995.

En el Anexo 2 se pueden encontrar los gráficos pertenecientes a estas curvas, con su ecuación e información del coeficiente de determinación. La raíz cuadrada de este da un coeficiente de correlación lineal superior a 0,995 para cada uno. En el Anexo 3 se incluye un ejemplo de un cromatograma de los estándares preparados a la mayor concentración de la curva. De manera adicional, se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) por el método de mínimos cuadrados simples. En el Cuadro 5 se muestra el resultado obtenido para cada estándar de polifenol.

Cuadro 5. Resultados del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Estándar de polifenol	LD µg/ml	LC µg/ml
Ácido 4-hidrobenczoico	0,42	1,41
Ácido 5-o-cafeolquínico	1,24	4,14
Ácido cafeico	0,70	2,33

Ácido clorogénico/Ácido vanílico	1,67	5,56
Ácido ferúlico/Ácido elágico	0,72	2,41
Ácido gálico	1,50	4,99
Ácido p-coumárico	0,39	1,30
Ácido protocatecuico	1,65	5,51
Ácido siríngico	0,77	2,56
Ácido-o-coumárico	0,31	1,02
Epigallocatequina	2,47	8,24
Kaempferol	0,62	2,07
Naringenina	0,62	2,10
Quercetina	1,19	3,96
Ramnetina	1,33	4,45
Rutina	0,88	2,92
Transresveratrol	0,55	1,81

4.2.2. Verificación de la precisión

La precisión del método se evaluó en forma de repetibilidad, para un total de 9 réplicas que se analizaron durante 3 días diferentes. Cada día se inyectaron 3 réplicas por nivel. En el Cuadro 6, se muestran los resultados del coeficiente de variación (CV) para el promedio de las 9 réplicas de la señal analítica de cada polifenol para evaluar la repetibilidad del método entre días y en el mismo día.

Cuadro 6. Resultados de la repetibilidad de método analítico

Estándar de polifenol	Nivel	Promedio del área	% CV
Ácido 4-hidroxibenzoico	Bajo	3,854	5,3
	Medio	10,145	1,0
	Alto	16,130	1,4
Ácido 5-o-cafeolquínico	Bajo	2,368	6,0
	Medio	8,198	9,5
	Alto	13,617	5,2
Ácido cafeico	Bajo	3,520	7,0
	Medio	8,040	6,8
	Alto	13,064	1,7
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	Bajo	1,350	14,9
	Medio	4,536	7,6
	Alto	6,677	5,3
Ácido ferúlico/Ácido elá-gico	Bajo	4,782	2,9
	Medio	13,260	2,4
	Alto	22,068	1,7
Ácido gálico	Bajo	9,455	10,8
	Medio	32,183	8,8
	Alto	59,953	7,1
	Bajo	9,121	1,8

Ácido p-coumárico	Medio	24,677	4,2
	Alto	41,000	3,9
Ácido protocatecuico	Bajo	1,198	11,1
	Medio	3,306	8,9
	Alto	6,340	3,5
Ácido siríngico	Bajo	7,297	7,2
	Medio	20,641	3,1
	Alto	34,665	3,5
Ácido o-coumárico	Bajo	16,332	1,7
	Medio	43,347	1,1
	Alto	71,081	1,3
Epigallocatequina	Bajo	1,359	14,2
	Medio	5,136	11,2
	Alto	8,782	8,1
Kaempferol	Bajo	2,151	12,3
	Medio	6,075	5,8
	Alto	9,824	5,9
Naringenina	Bajo	5,886	2,6
	Medio	15,139	2,1
	Alto	24,529	1,8
	Bajo	5,923	10,8

Quercetina	Medio	18,357	7,4
	Alto	32,507	6,7
Ramnetina	Bajo	1,513	14,9
	Medio	4,336	11,4
	Alto	7,075	10,0
Rutina	Bajo	1,473	14,9
	Medio	3,120	7,4
	Alto	5,018	6,2
Transresveratrol	Bajo	8,999	2,4
	Medio	24,107	2,4
	Alto	40,112	2,1

La precisión del método se evaluó con base en la repetibilidad (ver Cuadro 6), cada uno de los estándares cumplió con el criterio de aceptación al presentar un coeficiente de variación menor al 15 % en cada uno de los niveles de concentración medidos. La repetibilidad del método varió y la variabilidad más baja fue de 1.0 % para el caso del nivel medio del ácido 4-hidroxibenzoico y la más alta de 14.9 % para el caso del nivel bajo de rutina.

4.2.3. Verificación de exactitud y recuperación

Para la evaluación de la exactitud a cada nivel de concentración preparado, se determinó la diferencia entre la concentración obtenida y la nominal en las muestras de jocote y guanábana enriquecidas con estándar de ácido o-coumárico. En el Cuadro 7, se pueden observar los resultados de exactitud con base en el porcentaje de error relativo. La ecuación de la curva para el estándar de ácido o-coumárico proviene de la curva obtenida en la prueba de linealidad. Las concentraciones obtenidas para los tres niveles de concentración trabajados

tienen un porcentaje menor al 15 % de las concentraciones nominales, por lo que cumplen con el criterio de aceptación de la prueba.

Cuadro 7. Resultados para la evaluación de la exactitud durante la validación de la metodología analítica.

Estándar ácido o-coumárico/Ecuación de la curva: $Y = 1,8072x - 1,166$			
Exactitud			
Concentración nominal ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración promedio obtenida ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio del % de error relativo.	Criterio de aceptación
10	9,412	5,9	Se cumple en todas las concentraciones evaluadas en el criterio de exactitud porque el error relativo es menor al ± 15
80	81,138	11,1	
160	141,962	11,3	

En cuanto a la determinación del porcentaje de recuperación, los resultados se muestran en el Cuadro 8 en donde se especifica el valor obtenido de recuperación para cada uno de los niveles, además, la reproducibilidad entre ellos.

Cuadro 8. Resultados del porcentaje de recuperación del estándar de ácido o-coumárico en la verificación de la metodología analítica

Concentración de enriquecimiento	Promedio del porcentaje de recuperación	% CV	Criterio de aceptación
10 $\mu\text{g/ml}$	94,1	3,1	El % de recuperación están entre 83 %-115 % y el coeficiente de variación es menor al ± 15 %.
80 $\mu\text{g/ml}$	101,4	14,2	
160 $\mu\text{g/ml}$	88,7	3,3	

Como se puede observar, el promedio obtenido en cada nivel de concentración está dentro del intervalo de 83 %-115 % de la especificación, además,

son consistentes y reproducibles. En el Anexo 4 se incluye un cromatograma de la prueba de exactitud y recuperación de ácido o-coumárico a un nivel medio de concentración.

4.3. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES EN LOS FRUTOS

Como se mencionó, se extrajeron polifenoles de la fracción soluble y la fracción insoluble en cada fruto, provenientes de una muestra inicial de 100 mg. Una vez se pesaron las muestras, se extrajo primero los polifenoles de la fracción soluble usando metanol al 80 %, con lo que se logró obtener un extracto acuoso con color característico para cada fruto y de textura caramelizada.

Para el caso de la fracción insoluble, el extracto de polifenoles obtenido a partir de extracciones con acetato de etilo mostró un residuo más limpio y de color característico para cada fruto en la Figura 4 (A) para el fruto de jocote y 4 (B) para el fruto de pitahaya roja. De la misma manera, en la Figura 4 (C), 4 (D) y 4 (E) se presenta un ejemplo de los extractos solubles e insolubles que se obtienen para el fruto de marañón, nance y guanábana respectivamente; con la misma similitud, la fracción soluble presenta un residuo más acuoso y caramelizado y la fracción insoluble un residuo más limpio con un color característico por fruto.

Por último, en la Figura 4 (F) se muestran los extractos de la palma aceitera resuspendidos en una mezcla de 0,5 ml de agua: metanol (1:1), notándose que el extracto de la fracción insoluble presenta una coloración más intensa. Esta característica estuvo presente en la mayoría de las fracciones insolubles de los frutos, a excepción de la pitahaya roja, cuya fracción insoluble fue casi transparente mientras que la fracción soluble fue de una coloración fucsia intenso.

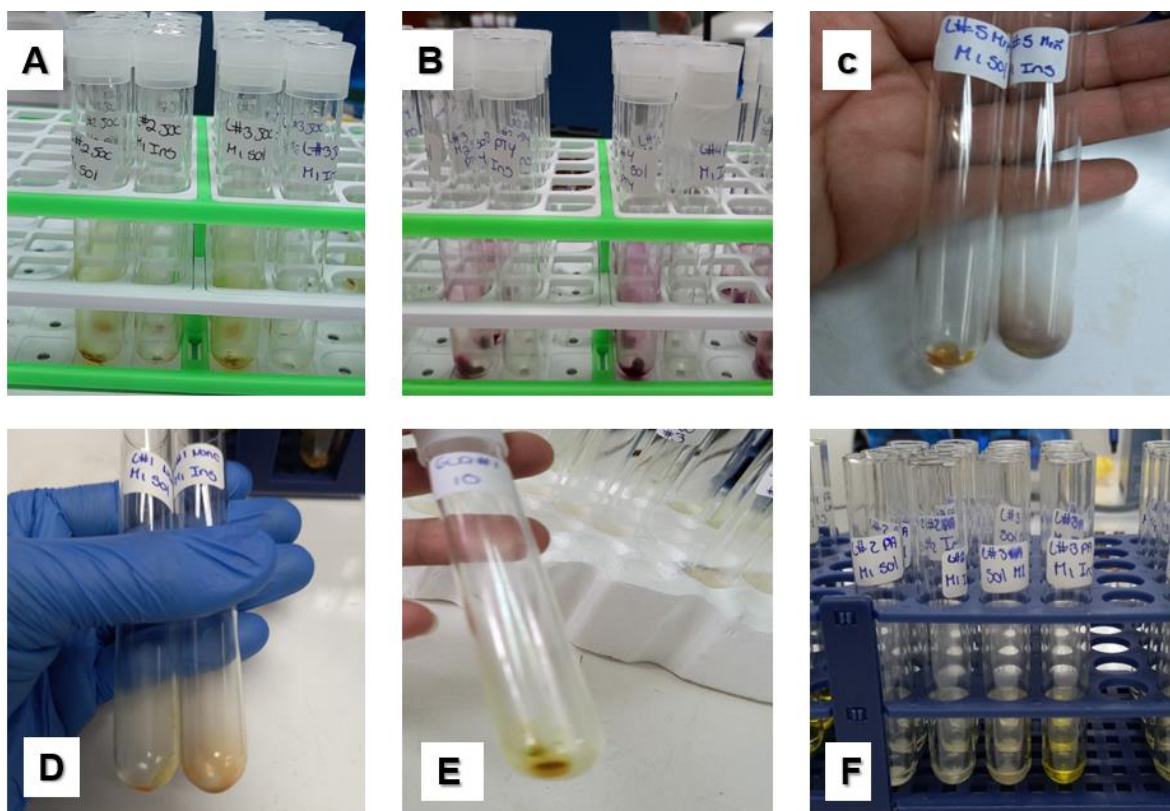


Figura 4. Extractos de polifenoles que se obtienen a partir de los frutos de jocote (A), pitahaya roja (B), marañón (C), nance (D), guanábana (E) y palma aceitera (F)

En el caso del jocote (A) predominó una tonalidad verde, en la pitahaya roja (B) una tonalidad fucsia solo en la fracción soluble, en el marañón (C) una tonalidad morada, en el nance (D) una tonalidad marrón, en la guanábana (E) una tonalidad verde y en la palma aceitera (F) predominó una tonalidad amarilla.

4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Para identificar los polifenoles se utilizó el tiempo de retención y su espectro de absorbancia en el Uv-Vis, que se obtienen con el uso de estándares auténticos de cada polifenol. En el Cuadro 9 se resumen estos parámetros para cada polifenol.

Cuadro 9. Tiempo de retención de los estándares de polifenoles y su espectro ultravioleta-visible (Uv-Vis) para la identificación de polifenoles en los frutos en estudio.

Estándar de polifenol	Tiempo de retención	Espectro Uv-Vis		
Ácido 4-hidroxibenzoico	8,597	193	254.66	-
Ácido 5-o-cafeolquínico	9,56	217	248	323
Ácido cafeico	9,437	216	240	322
Ácido clorogénico	8,97	215	230	-
Ácido elágico	12,15	196	253.63	366.46
Ácido ferúlico	12,15	235	323	-
Ácido gálico	2,34	201	220	270
Ácido o-coumárico	14,017	211	277	325
Ácido p-coumárico	11,427	209	310	-
Ácido protocatecuico	4,933	200	215	260
Ácido siríngico	9,78	215	274.85	-
Ácido vanílico	8,97	203	215	260.78
Epigallocatequina	11,983	203	277	-
Kaempferol	21,21	193	266	366
Naringenina	19,89	210	223	290
Quercetina	18,023	201	255	370
Ramnetina	22,477	202	257	370

Rutina	11,737	202	256.9	355.23
Transresveratrol	15,773	215	319	-

Las concentraciones obtenidas en las curvas de calibración en $\mu\text{g/ml}$ se reportaron en $\mu\text{g/g}$. Para esto, la señal de área obtenida para cada polifenol en la muestra se despejó de la ecuación de la curva obteniéndose la concentración en $\mu\text{g/ml}$, se multiplicó por el factor de dilución y se dividió entre el peso de la muestra para obtener la concentración en $\mu\text{g/g}$. La fórmula se detalla a continuación:

$$C_n \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} = C_n \mu\text{g/mL} \frac{\text{Factor de dilución (mL)}}{\text{peso de la muestra en gramos (g)}}$$

Como los extractos de polifenoles que se obtienen se resuspendieron en 0,5 ml este equivale al factor de dilución y el peso de las muestras fue alrededor de 0,1 g. En el Cuadro 10 se presentan los resultados del perfil de polifenoles, tanto en la fracción soluble como insoluble que se identificaron y cuantificaron en el fruto de palma aceitera.

Cuadro 10. Polifenoles presentes en el fruto de palma aceitera

Polifenol	Concentración $\mu\text{g/g}$ promedio \pm intervalo de confianza	
	Fracción soluble	Fracción Insoluble
Rutina	22,94 \pm 8,55	45,31 \pm 7,64
Ácido ferúlico/Ácido elá-gico	nd	38,73 \pm 4,62
Quercetina	nd	36,36 \pm 1,38
Ácido 4-hidrobenczoico	4,60 \pm 0,33	31,33 \pm 3,51
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	nd	24,36 \pm 9,39

Ramnetina	11,36 ±1,67	nd
Siríntrico	10,72 ± 1,14	nd
Ácido 5-o-cafeolquínico	9,87 ± 0,57	nd
Ácido-o-coumárico	7,39 ± 1,46	nd
Transresveratrol	7,39 ± 0,61	nd
Kaempferol	5,78 ± 0,20	nd
Ácido cafeico	0,82 ± 0,11	nd
Polifenoles totales	80,87	176,09

Los resultados de la identificación y cuantificación de polifenoles presentes en el fruto de la palma aceitera indican que la fracción insoluble presenta mayor concentración de polifenoles (176,09 µg/g) en comparación con su fracción soluble (80,87 µg/g), aunque en esta última haya presencia de 9 tipos de polifenoles y en la fracción insoluble solo 5 (ver Cuadro 10). Los polifenoles que se encuentran en mayor concentración son: rutina, ácido ferúlico, quercetina, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido vanílico y en menor concentración ramnetina, ácido siríntrico, ácido 5-o-cafeolquínico, ácido o-coumárico, transresveratrol, kaempferol y ácido cafeico.

Para la palma aceitera también se obtuvo un polifenol que no se identificó, con un área promedio de 25.717. Se puede afirmar que de los polifenoles presentados en el Cuadro 9 este polifenol sin identificar fue el de mayor área comparada con la del polifenol cuantificado en mayor concentración (rutina) cuya área fue de 1.4602 en promedio. Al tener mayor área se puede afirmar que está presente en una mayor concentración que el resto de los polifenoles con áreas menores, como se puede observar en el Anexo 5 cromatograma 7. En el Cuadro 11 se reportan los resultados del perfil de polifenoles presentes en el fruto de marañón.

Cuadro 11. Polifenoles presentes en el fruto de marañón

Polifenol	Concentración $\mu\text{g/g}$ promedio \pm intervalo de confianza	
	Fracción soluble	Fracción insoluble
Ácido ferúlico/Ácido elá-gico	1826,41 \pm 298,50	nd
Ácido gálico	nd	1139,55 \pm 259,65
Quercetina	140,02 \pm 28,87	239,36 \pm 85,18
Ácido 4-hidrobenczoico	27,89 \pm 3,40	nd
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	27,77 \pm 4,41	nd
Ácido siríngico	26,81 \pm 6,64	nd
Kaempferol	17,28 \pm 3,49	nd
Ácido p-coumárico	14,64 \pm 2,40	nd
Ácido 5-o-cafeolquínico	12,70 \pm 2,33	nd
Polifenoles totales	2093,11	1378,91

En el fruto de marañón la fracción soluble presentó mayor concentración total de polifenoles (2093,11 $\mu\text{g/ml}$) y 8 tipos de polifenoles. La fracción insoluble presentó menos concentración (1378 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con la fracción soluble y solo se encontraron 2 tipos de polifenoles. Los polifenoles en mayor concentración fueron: ácido ferúlico, ácido gálico y quercetina y en menor concentraciones los polifenoles de ácido hidroxibenzoico, ácido clorogénico/ ácido vanílico, ácido siríngico, kaempferol, ácido p-coumárico y ácido 5-o-cafeolquínico.

En el Cuadro 12 se reportan los resultados del perfil de polifenoles presentes en la fracción soluble e insoluble en el fruto de nance. En la fracción soluble se identificaron y cuantificaron 8 tipos de polifenoles con una concentración

total de 443,94 µg/ml menor en comparación con la concentración total presentada por la fracción insoluble (602,77 µg/ml) y en la que se identificaron y cuantificaron 7 tipos de polifenoles. Los polifenoles que se encontraron en mayor concentración en el fruto independiente de la fracción fueron quercetina, ácido gálico, ácido clorogénico/ ácido vanílico, ácido 5-o-cafeolquínico, ácido 4-hidroxibenzoico y epigallocatequina. Los polifenoles en menor concentración fueron: ácido protocatecuico, ácido ferúlico/ ácido elálgico, ácido siríngico, ácido-o-coumárico y ácido cafeico.

Cuadro 12. Polifenoles presentes en el fruto de nance

Polifenol	Concentración µg/g promedio ± intervalo de confianza	
	Fracción soluble	Fracción insoluble
Quercetina	113,90 ± 6,94	226,55 ± 36,73
Ácido gálico	nd	222,16 ± 25,50
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	114,01 ± 20,57	nd
Ácido 5-o-cafeolquínico	60,64 ± 21,30	43,19 ± 7,30
Ácido 4-hidrobenzoico	41,61 ± 2,52	55,46 ± 7,00
Epigallocatequina	51,08 ± 9,43	nd
Ácido protocatecuico	nd	25,73 ± 2,19
Ácido ferúlico/Ácido elálgico	31,98 ± 5,50	16,96 ± 3,17
Ácido siríngico	18,00 ± 4,16	nd
Ácido-o-coumárico	12,72 ± 0,69	nd
Ácido cafeico	nd	12,72 ± 2,64

Polifenoles totales	443,94	602,77
---------------------	--------	--------

En el Cuadro 13 se reportan los resultados de los polifenoles que se encontraron en la fracción soluble e insoluble en la guanábana. Los polifenoles que se identificaron y cuantificaron en el fruto de guanábana fueron 8 en total. La fracción insoluble presentó una mayor concentración de compuestos fenólicos (260,27 µg/g) que la fracción soluble (140,41 µg/g). Los polifenoles en mayor concentración fueron el ácido siríngico, ácido gálico y el ácido ferúlico/ácido elá-gico y en menor concentración el ácido protocatecuico, ácido 5-cafeolquínico, ácido clorogénico/ácido vanílico, el ácido 4-hidrobenzoico y rutina.

Cuadro 13. Polifenoles presentes en el fruto de guanábana

Polifenol	Concentración µg/g promedio ± intervalo de confianza	
	Fracción soluble	Fracción insoluble
Ácido siríngico	102,72 ± 15,18	7,83 ± 0,10
Ácido gálico	65,87 ± 3,21	65,88 ± 1,80
Ácido ferúlico/Ácido elá-gico	43,67 ± 2,45	16,60 ± 0,94
Ácido protocatecuico	nd	26,89 ± 6,81
Ácido 5-o-cafeolquínico	nd	8,72 ± 0,31
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	31,82 ± 6,97	5,16 ± 0,72
Ácido 4-hidrobenzoico	16,19 ± 5,57	6,21 ± 0,91
Rutina	nd	3,12 ± 0,52
Polifenoles totales	260,27	140,41

De la misma forma, en la guanábana se obtuvieron 3 picos que no se identificaron porque su tiempo de retención no coincidió con ninguno de los estándares, pero que al igual que en el fruto de palma aceitera presentaron áreas considerables (en comparación con el área del polifenol cuantificado en menor concentración, ácido cafeico, cuya área fue de 1.061 aproximadamente). Estos picos que no se identificaron tuvieron áreas de 1.402, el segundo 2.420 y el tercero de 7.426 (Anexo 5 cromatograma 8).

En el Cuadro 14 se presentan los resultados de polifenoles que se identificaron y cuantificaron en pitahaya roja. Además, en el Anexo 5 cromatograma 9, se puede apreciar la presencia de 2 picos no identificados al minuto 24 y 25 aproximadamente, el primero con un área promedio de 2.639 y el segundo de 3.075. En comparación con el área del polifenol de epigallocatequina que fue en promedio de 1.198, se puede sugerir que estos 2 picos no identificados andan en una concentración parecida a la epigallocatequina.

Cuadro 14. Polifenoles presentes en el fruto de pitahaya roja

Polifenol	Concentración $\mu\text{g/g}$ promedio \pm intervalo de confianza	
	Fracción soluble	Fracción insoluble
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	225,99 \pm 21,81	nd
Ácido cafeico	124,88 \pm 26,03	nd
Ácido 5-o-cafeolquínico	70,23 \pm 10,79	nd
Epigallocatequina	nd	21,54 \pm 3,69
Ácido O-coumárico	8,65 \pm 1,28	nd
Ácido p-coumárico	nd	7,78 \pm 0,87
Naringenina	nd	2,63 \pm 0,18
Polifenoles totales	429,75	31,95

Para el fruto de pitahaya roja se determinó la presencia de 7 tipos de compuestos fenólicos. En la fracción soluble predominó la presencia de ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido cafeico, ácido 5-o-cafeolquínico y ácido o-coumárico con una concentración total de 429,75 $\mu\text{g/g}$. En cambio, en la fracción insoluble predominó la presencia de epigallocatequina, ácido p-coumárico y naringenina sumando una concentración total de 31,95 $\mu\text{g/g}$.

Para el caso del jocote, en el Cuadro 15 se reportan los resultados del perfil de polifenoles presentes en el fruto. Se reporta la presencia en la fracción soluble de 5 tipos de polifenoles, los cuales son: ácido siríngico, ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-coumárico y

transresveratrol sumando una concentración total de 213,47 µg/g. En el caso de la fracción insoluble solo presentó ácido p-coumárico a una concentración de 4,43 µg/g.

Cuadro 15. Polifenoles presentes en el fruto de jocote

Polifenol	Concentración µg/g promedio ± intervalo de confianza	
	Fracción soluble	Fracción insoluble
Ácido siríngico	90,34 ± 15,92	nd
Ácido clorogénico/Ácido vanílico	65,18 ± 13,63	nd
Ácido 4-hidrobenczoico	27,64 ± 2,80	nd
Ácido p-coumárico	18,59 ± 3,14	4,43 ± 0,16
Transresveratrol	11,72 ± 0,69	nd
Polifenoles totales	213,47	4,43

En algunos casos, fue necesaria la aplicación de la prueba de Grubbs para el descarte de resultados anómalos, para hacer esta eliminación de datos se parte del hecho de que las muestras poseen una distribución normal. En el Anexo 6 se presenta un ejemplo de la aplicación de la prueba, en este caso para el polifenol rutina presente en la fracción soluble de la palma aceitera. En ese caso, el valor t de la tabla para 20 datos es de 2,56 y el t obtenido es de 2,74 por lo que el dato 103,11 se considera dato atípico y, por ende, se puede eliminar. Este fue el enfoque que se aplicó cada vez que se tuvo la sospecha de un dato atípico.

Por último, en la Figura 5 y la Figura 6 se presenta el resultado del análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés, Principal Component Analysis) realizado con el *software* estadístico R para observar una diferenciación en el agrupamiento de los frutos según su contenido de polifenoles. El

análisis de PCA para los polifenoles solubles e insolubles se realizó por separado. El PCA indica que los componentes 1 y 2 explican el 42 % de la variación de los datos de los polifenoles solubles y el 54.5 % de la variación de los datos de los polifenoles insolubles.

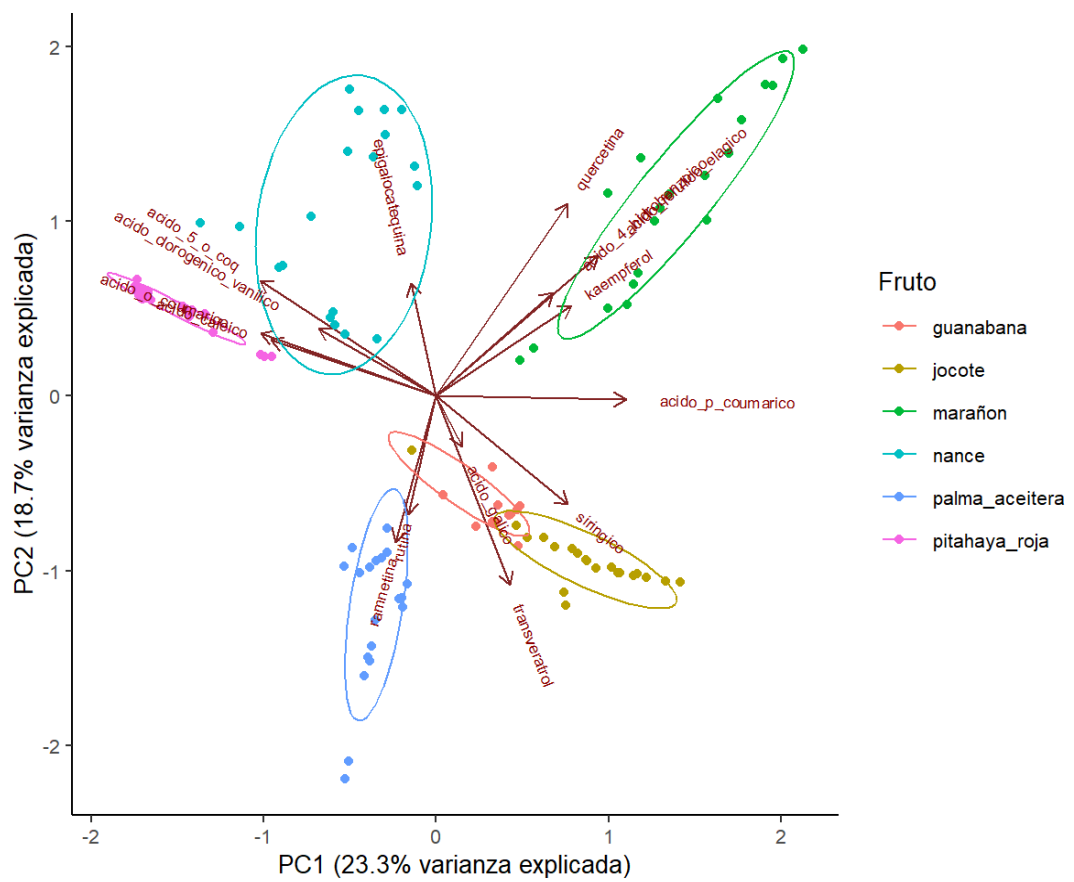


Figura 5. Análisis de componentes principales de polifenoles solubles en los frutos

En el análisis de componentes principales (PCA) de la fracción soluble e insoluble de los extractos de los frutos en estudio se resume toda la información del perfil de cada fruto (ver Figura 5 y Figura 6).

Para la fracción soluble se pueden observar diferentes agrupaciones entre los frutos (ver Figura 5). Los polifenoles del fruto de palma aceitera, guanábana y jocote son cercanos entre sí, esto indica cierta similitud en el perfil, en este caso estos 3 frutos comparten la presencia de ácido 4-hidroxibenzoico y ácido siríngico; la guanábana y el jocote están más cercanos debido a la presencia de ácido clorogénico en ambos. Además, se puede observar cuál es el polifenol que los diferencia, por ejemplo, la palma aceitera es el único fruto que presenta ramnetina y rutina en su fracción soluble, la guanábana fue el único fruto que presentó ácido gálico en su fracción soluble y en el caso del jocote, la presencia de transresveratrol.

Para el análisis de PCA del perfil de polifenoles en la fracción insoluble de los frutos (ver Figura 6), se puede apreciar la formación de 3 agrupaciones. En el cuadrante inferior izquierdo se ubicó el fruto de pitahaya roja, alejado completamente de los demás frutos, indicativo de que su perfil es diferente al resto de los frutos, este fue el único fruto que presentó los polifenoles de epigallocatequina, naringenina y ácido p-coumárico. El fruto de jocote presentó una pequeña cantidad de ácido p-coumárico, pero no fue posible ubicarlo en el plano dimensional del PCA, pues solo se identificó un polifenol insoluble en ese fruto, por lo que la información no es suficiente para atribuirle similitudes con el resto de los frutos y agruparlo en un análisis de PCA.

5. DISCUSIÓN

5.1. TRATAMIENTO DE LOS FRUTOS

La implementación del método de Soxhlet (ver Figura 3B) para la eliminación de impurezas de aceites y grasas en la palma aceitera como un pretratamiento, permitió remover la mayor cantidad posible de contenido graso en la muestra. A pesar de que se trató de homologar las condiciones de extracción para los 5 lotes de palma aceitera a un tiempo promedio de 6 horas de extracción con solvente, se pudo observar, en el momento de la obtención de los extractos, tanto en la fracción soluble como insoluble, la presencia de contenido graso en todas las muestras. Shahidi (2001) menciona que, cuando se utiliza hexano para extraer grasas un periodo de extracción de 8 horas es lo adecuado.

Para compensar que la extracción de grasas por Soxhlet fue de aproximadamente 6 horas en lugar del mínimo de 8 horas, fue necesario un paso adicional en el proceso de extracción que fue hacer lavados con hexano, hasta la obtención de extractos limpios. Para obtener mejores resultados en la remoción de grasas y aceites presentes en la palma aceitera es necesario ampliar el tiempo del proceso al mínimo de 8 horas, el tamaño de la muestra debe ser lo más pequeño posible, es decir, la muestra debe estar cortada en trozos muy pequeños y considerar la cantidad de volumen de solvente empleado. Pérez *et al.* (2009) recomiendan que, cuanto mayor cantidad de solvente y menor tamaño de muestra, el proceso de extracción usando la técnica de Soxhlet dará mejores resultados.

En cuanto al pretratamiento de los frutos de marañón, nance, guanábana, pitahaya roja y jocote, la técnica de liofilización permitió obtener muestras secas, preservando su composición y propiedades químicas. Ramírez (2006) afirma que, la liofilización es uno de los mejores métodos de secado para muestras orgánicas, ya que permite conservar las características organolépticas y no altera la estructura fisicoquímica del producto. La única desventaja de la técnica

fue la duración del proceso de secado, puesto que, para el tratamiento de los frutos, se tardó alrededor de 5 días por cada fruto. Esto es necesario para remover la mayor cantidad de agua libre en el fruto y así evitar el crecimiento de microorganismos que puedan deteriorarlos (Parzanese, 2022).

5.2. VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para la verificación de la metodología analítica de identificación y cuantificación de polifenoles se estableció en un principio que los parámetros por evaluar eran linealidad, precisión, exactitud y porcentaje de recuperación. No obstante, también se evaluó el límite de detección y cuantificación.

Para el parámetro de linealidad se puede observar el Cuadro 4, en el que se reportan los resultados de la curva de calibración para cada uno de los estándares de polifenoles, los cuales cumplieron con el criterio de aceptación del porcentaje de error relativo $\leq 15\%$ de las concentraciones nominales que establece la FDA (2018). Al menos 8 de los 10 puntos de calibración que equivalen al 75 % de los puntos calibrados cumplen con el anterior criterio.

Además, todas las curvas presentaron un coeficiente de correlación lineal superior al 0,995, lo que implica una correlación lineal fuerte y, en este caso, positiva entre las 2 variables. Es decir, la señal de área para cada estándar de polifenol tiene una correlación directa con la concentración a la que se preparó cada estándar, por lo tanto, a valores grandes de área le corresponden valores altos de concentración.

En cuanto a la determinación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), reportados en el Cuadro 5 para el caso del LD, estos valores representan la menor concentración en $\mu\text{g/ml}$ en la que el polifenol de interés presente en una muestra puede detectarse, pero no cuantificado necesariamente. En el caso del LC, los valores reportados son la concentración en $\mu\text{g/ml}$ en la cual el polifenol de interés puede cuantificarse con precisión y exactitud aceptables, como lo indica la USP 43 NF 38 en el capítulo 1225 sobre validación de procedimientos (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2022).

Estos dos parámetros no poseen valores superiores o inferiores que deban cumplir, sino que más bien son descriptivos al brindar información en el caso del LD de la concentración más baja del analito que puede detectarse por el método con un nivel de confianza específica y en el caso del LC, la concentración más baja a la que el analito puede cuantificarse de manera confiable. Por ejemplo, el ácido protocatecuico obtuvo un LD 1,652 $\mu\text{g/ml}$ y un LD de 5,5066 $\mu\text{g/ml}$ (ver Cuadro 5).

Lo anterior lo que indica es que a partir de concentraciones alrededor de 1,652 $\mu\text{g/ml}$ este analito ya puede identificarse de manera confiable, por el método analítico y que a partir de concentraciones de 5,5066 $\mu\text{g/ml}$ se pueden obtener resultados exactos y precisos de cuantificación. En el Cuadro 6 sobre la evaluación de la precisión del método, al nivel bajo de concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvieron resultados precisos para el ácido protocatecuico y así con todos los demás estándares de polifenoles.

En cuanto a la evaluación de los parámetros de precisión, exactitud y recuperación, en el Cuadro 6 se puede observar que cada uno de los estándares tuvo resultados consistentes a los 3 niveles de concentración trabajados al presentar coeficientes de variación menores al 15 %. Seguidamente, en cuanto a la determinación de la exactitud del método (ver Cuadro 7), los resultados fueron exactos al presentar un porcentaje de error relativo menor al 15 % de las concentraciones nominales y para el porcentaje de recuperación (ver Cuadro 8) los 3 niveles de concentración trabajados presentaron recuperación dentro del criterio de aceptación (83 %-115 %).

Lo anterior demuestra que la metodología de análisis produce resultados precisos, exactos y se garantiza que la recuperación del analito es eficiente y reproducible en las condiciones del procedimiento descritas. Esto ya que cumple con los criterios establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (FDA, 2018).

En resumen, las características de desempeño evaluadas permiten establecer que el método para identificar y cuantificar polifenoles en estos frutos cumple con los requisitos para la aplicación analítica prevista en cuanto a que el método es exacto, preciso y lineal en un rango de 1 a 45 µg/ml para los polifenoles; ácido cafeico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico, epigalocatequina, ramnetina, ácido siríngico, ácido elágico, ácido vanílico, naringenina, kaempferol, 5-o-cafeolquínico, ácido clorogénico, ácido o-coumárico, transresveratrol y rutina y, en un rango de 4 a 180 µg/ml, para la quercetina y ácido gálico.

La única interferencia considerable en el proceso de validación fue la coelución de picos durante la corrida cromatográfica entre los estándares de ácido ferúlico y ácido elágico y entre los estándares de ácido clorogénico con el ácido vanílico. Se había considerado que era un evento posible, puesto que cuando se realizaron inyecciones de prueba para determinar el tiempo de retención (TR) de los estándares, estos presentaron un TR igual y durante la validación se vio reflejado.

En el cromatograma 3 (ver Anexo 3) se puede observar la separación de las señales en una mezcla de estándares de polifenoles que se realizó para identificar el tiempo de retención de cada uno de los polifenoles y donde se evidencia un solo pico para los estándares de ácido ferúlico y ácido elágico a un TR de 12,923 min y un solo pico para el ácido clorogénico y ácido vanílico a un TR de 9,850 min. Esta coelución de analitos es posible que se deba al tipo de gradiente empleado, las características de la columna, la fase móvil y a la gran cantidad de analitos por identificar. Intentar hacer cambios de más en las condiciones cromatográficas para separar estos compuestos, puede comprometer la separación de los demás polifenoles como lo indica la Farmacopea Europea (Ph.Eur) cuando la elución es por gradiente se requiere de mayor precaución y solo se permiten cambios menores (Ph.Eur, 2022).

Esta interferencia no hubiera sido un inconveniente con el empleo de tecnologías más avanzadas para la identificación de compuestos como la detección

por masas, una técnica más selectiva y específica, porque el espectro resultante muestra la abundancia de las diversas especies iónicas presentes en función de la masa y el número de cargas elementales positivas o negativas de sus iones (m/z). Estas características son únicas para cada compuesto y es como una especie de huella digital, lo que constituye su perfil isotópico (PH.Eur, 2022).

Por consiguiente, para reportar estos resultados se tomó la decisión de unificarlos, por lo que a lo largo del estudio se puede apreciar la creación de una sola curva para ácido ferúlico/ácido elágico y otra curva solo de ácido clorogénico/ácido vanílico (ver cromatograma 1, Anexo 3). En el caso de la identificación de estos compuestos en los frutos en estudio fue necesaria la ayuda de referencias bibliográficas para descartar la presencia de uno o del otro compuesto, por ejemplo, en el fruto de marañón ya se ha reportado la presencia de ácido ferúlico (Marc *et al.*, 2012), en el fruto de palma aceitera también ha sido reportada la presencia de este compuesto (Neo *et al.*, 2010). No obstante, en el caso del fruto de pitahaya roja y guanábana no fue posible descartar entre ácido clorogénico y ácido vanílico, porque no se ha reportado la presencia de estos compuestos en las primeras investigaciones sobre el perfil de polifenoles en estos frutos (Esquivel *et al.*, 2020; Jiménez *et al.*, 2014).

5.3. EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

En cuanto a los extractos de polifenoles que se obtienen en la fracción soluble e insoluble, cada fruto presentó un color característico (ver Figura 4). En los frutos, Mínguez (2022) menciona que los compuestos secundarios a los que se les atribuye funciones de pigmentación son las antocianinas, carotenoides y clorofilas. En el caso de la pitahaya roja, de acuerdo con Esquivel *et al.* (2007) posee un gran contenido de betalaínas responsables de la pigmentación rojo intenso, característico del fruto.

Con base en lo anterior, la presencia o ausencia de color en los extractos que se obtienen en los frutos en estudio puede ser un indicativo de la existencia o no de polifenoles en el extracto, puesto que las antocianinas es un tipo de

polifenol. Esto coincide con el resultado obtenido en la fracción insoluble del jocote en donde el extracto no tuvo coloración (ver Figura 4 A) y durante el análisis de identificación y cuantificación de polifenoles en esta fracción del jocote, no se encontró presencia de estos compuestos.

5.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN FRUTOS

Los polifenoles que se identificaron y cuantificaron en palma aceitera fueron rutina, ácido ferúlico, quercetina, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido vanílico en concentraciones mayores y en menor concentración ramnetina, ácido siríntrico, ácido 5-o-cafeolquínico, ácido o-coumárico, transresveratrol, kaempferol y ácido cafeico. La presencia de estos polifenoles concuerda con las observaciones de otros investigadores, que demuestran presencia de ácido ferúlico y vanílico en lugar de elágico y clorogénico, porque ya se ha reportado la identificación de estos polifenoles en palma aceitera, así como el ácido 4-hidroxibenzoico, siríntrico, cafeico o-coumárico (Neo *et al.*, 2010). En el caso de rutina, quercetina, transveratrol, kaempferol y ramnetina no se encontraron previamente en palma aceitera, sin embargo, otros estudios se realizan con palmas aceiteras cultivadas en otras regiones distintas a Costa Rica y de variedades diferentes, lo que puede influir en el perfil de polifenoles.

Asimismo, la palma aceitera presentó un pico con TR de 10,803 min con una señal de área considerablemente mayor que las áreas de los polifenoles que sí se identificaron y cuantificaron (ver cromatograma 8, en Anexo 5). Al respecto es importante que se realicen más investigaciones que incluyan nuevos tipos de estándares que no fueron previstos en esta investigación o el empleo de otra técnica de detección, para determinar qué tipo de polifenol es el que está presente, puesto que con la lógica de que a mayor señal de área mayor es la concentración del polifenol, este indudablemente es el polifenol predominante en la palma aceitera.

En el caso del fruto de marañón, se identificaron y cuantificaron 9 tipos de polifenoles (ver Cuadro 11). En este fruto, la fracción soluble obtuvo una mayor

concentración total de polifenoles (2093,11 $\mu\text{g/g}$), predominando la presencia de ácido ferúlico. La fracción insoluble también presentó una alta concentración total de polifenoles (1378,91 $\mu\text{g/g}$) aportada en mayor medida por los polifenoles de ácido gálico y quercetina. Los resultados de esta investigación concuerdan con otros estudios realizados en jugo y pseudofruto de marañón, los cuales reportan la presencia de ácido gálico, quercetina, ácido ferúlico y ácido p-cumárico (Marc *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2011; Broinizi *et al.*, 2007).

No se encontró la presencia de naringenina y ácido cafeico que reportaron Marc *et al.* (2012), ni tampoco de ácido protocatecuico y ácido cinámico reportado por Queiroz *et al.* (2011), en jugo de marañón. Tampoco se identificó ácido salicílico, ácido quínico, ácido gentísico y cafeico reportado por Broinizi *et al.* (2007) en el pseudofruto del marañón. Bravo (1998) considera que la variedad de los frutos, así como la madurez y factores ambientales son otros posibles factores que pueden influir en los resultados, además, a condiciones de cosecha, clima, método de extracción y de análisis (Queiroz *et al.*, 2011).

Por lo tanto, esta tesis contribuye en la detección en marañón de los polifenoles de ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido 5-cafeolquínico, ácido siríngico y kaempferol. El marañón fue el fruto que presentó la mayor concentración de polifenoles totales, atribuido principalmente a la presencia de ácido gálico, quercetina y ácido ferúlico, los restantes 6 polifenoles se encuentran en concentraciones mucho más pequeñas (rango entre 12 a 17 $\mu\text{g/g}$).

En cuanto al fruto de nance, los polifenoles en mayor concentración fueron quercetina, ácido gálico, ácido 5-o-cafeolquínico, ácido clorogénico/ ácido vanílico y ácido 4-hidroxibenzoico y en menor concentración fueron ácido siríngico, epigallocatequina, ácido ferúlico/ácido elágico, ácido-o-coumárico, ácido protocatecuico y ácido cafeico. En comparación con el estudio realizado por Maldini *et al.* (2021), los resultados en el presente trabajo difieren, puesto que en ese estudio determinaron particularmente compuestos derivados del ácido galloilo.

Esta variación de resultados entre un estudio y otro probablemente se vio influenciada por diferentes factores como el método de extracción, el origen del fruto y el uso de estándares de polifenoles que se tengan a disposición para el análisis (Meireles *et al.*, 2008). No obstante, en un estudio realizado en México por López *et al.* (2014), sobre compuestos funcionales en nance, lograron identificar y cuantificar los polifenoles de ácido gálico, ácido protocatecuico, catequinas y derivados, quercetina y derivados, ácido siríngico, ácido cafeico y ácido cumárico, resultados muy similares a los que se obtienen en esta tesis.

En el caso del fruto de guanábana, los polifenoles en mayor concentración fueron el ácido siríngico, ácido gálico y el ácido ferúlico/ácido elágico y en menor concentración el ácido protocatecuico, ácido 5-cafeolquínico, ácido clorogénico/ácido vanílico, el ácido 4-hidrobenczoico y rutina. En la investigación realizada por Jiménez *et al.* (2014), los compuestos que predominaron fueron derivados del ácido cinámico y ácido *p*-coumárico; como lo indica el autor, son necesarios más estudios para asignar compuestos no identificados hasta el momento. Además, Sánchez *et al.* (2012) mencionan que los estudios efectuados hasta el momento para la identificación de los compuestos presentes en la guanábana son poco profundos, porque se basan en la determinación de los compuestos mediante un mecanismo específico, por ejemplo, el contenido fenólico total (método de Folin Ciocalteu).

No obstante, en un estudio realizado por Aguilar *et al.* (2019), identificaron un total de nueve compuestos fenólicos (ácido gálico, cumárico, cinámico, cafeico, clorogénico, protocatecuico, 4-Hidroxibenzoico, siríngico y neoclorogénico) en piel, semilla, culomela y pulpa de guanábana, que resultan muy similares a los que se obtienen en este proyecto de investigación. Los autores no reportaron la presencia de ácido ferúlico/ácido elágico, ácido 5-cafeolquínico y rutina que sí se reporta en el presente estudio.

Para el fruto de pitahaya roja en la fracción soluble predominó la presencia de ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido cafeico, ácido 5-o-cafeolquínico y ácido o-coumárico, mientras que en la fracción insoluble predominó la presencia

de ácido p-coumárico, epigallocatequina y naringenina. Estos resultados son diferentes a los que obtuvieron Esquivel *et al.* (2020), en pitahaya nativa de Costa Rica en donde reportaron la presencia de ácido gálico, tirosina y acetilcumarina.

Esta diferencia en resultados probablemente se deba a que se aplicaron metodologías de análisis diferentes y, además de los estándares que emplearon estos autores, como lo sugiere Baxter y Moss (citados en Ignat *et al.*, 2011), existen alrededor de 8000 estructuras de compuestos fenólicos que se identifican en la naturaleza, por lo tanto, cuanto mayor sea la cantidad de estándares de polifenoles a disposición mayor es la capacidad de identificar estos compuestos y así evitar la presencia de picos sin identificar. Esta situación se puede observar en el cromatograma 10 (ver Anexo 5), en donde no se identificaron 2 picos, uno al minuto 24 y el otro al minuto 25.

Por otra parte, el fruto de jocote presentó en mayor concentración el polifenol de ácido sirínico, seguido por el ácido clorogénico, ácido hidroxibenzoico, ácido p-coumárico y transresveratrol, de todos estos compuestos el ácido clorogénico es el que ya ha sido reportado en jocote (Engels *et al.*, 2012). Asimismo, fue el fruto que presentó menor concentración de compuestos fenólicos que se identificaron y cuantificaron con el método que se utiliza.

De la misma forma, en un estudio realizado por Sabino (2017), se reportó la presencia de kaempferol, ácido p-coumárico, quercetina, rutina, ácido cafeico y ácido elágico. La diferencia de compuestos fenólicos reportados en esta tesis para el jocote se puede atribuir al método empleado y a la variedad del fruto. Cabe destacar que en el estudio realizado por Sabino se analizaron dos tipos de especies (la *Spondia purpurea* y la *S. mombin*) y alrededor de nueve variedades, que presentaron diferencias de contenido de polifenoles entre una y otra. No obstante, la presencia de ácido p-coumárico predominó en la mayoría de las variedades de jocote que se estudian, lo que también coincide con esta investigación.

En cuanto al análisis de PCA, se puede confirmar que el fruto de marañón y nance comparten un perfil de compuestos fenólicos muy similar, con la diferencia de que, el fruto de marañón posee una mayor concentración de polifenoles totales. Asimismo, el perfil de polifenoles del fruto de palma aceitera, jocote y guanábana presentan similitud en el tipo de polifenoles presentes y en la concentración en que se encuentra. Por otra parte, el fruto de pitahaya roja presenta un perfil más único, pero con cierta similitud al fruto de nance.

Como se puede observar en la Figura 5 en cuanto al perfil de polifenoles en la fracción soluble de los frutos se formaron tres agrupaciones, en el cuadrante superior derecho se ubicó el fruto del marañón, en el cuadrante superior izquierdo los frutos de pitahaya roja y nance y en los cuadrantes inferiores se agruparon los frutos de palma aceitera, guanábana y jocote. Como lo indican Urrunia y Palomino (2010) en el PCA las relaciones entre las variables, en este caso entre frutos y los polifenoles, se basan en la distancia en la que se encuentre uno de otros, es decir, si se agrupan es porque comparten similitudes en su perfil de polifenoles.

De la misma forma cada vector (polifenol) ejerce su influencia en cada fruto, si el vector es muy cercano a 0 significa que no tiene influencia en el fruto y si es muy cercano a 1 o -1, el polifenol afecta considerablemente al fruto en el plano dimensional del PCA (Suárez, 2007). Por ejemplo, en el caso del fruto de pitahaya roja, en la Figura 5 se puede apreciar cómo el vector de ácido cafeico afecta de manera considerable a este fruto, ya que en la fracción soluble fue el único fruto en presentar este compuesto. Lo mismo con el vector del polifenol de epigallocatequina para el fruto de nance, afecta únicamente a este fruto porque fue el único en presentar este compuesto en su fracción soluble.

Para la fracción insoluble en la Figura 6 se puede apreciar la formación de tres agrupaciones también, en el cuadrante inferior izquierdo el fruto de pitahaya roja, en el cuadrante inferior derecho los frutos de nance y marañón y en el cuadrante superior derecho los frutos de palma aceitera y guanábana. Siguiendo el mismo comportamiento descrito para la fracción soluble, los frutos que se

agrupan presentan similitud en su perfil de polifenoles y, en este caso, la pitahaya roja no comparte ninguna similitud con los polifenoles presentes en su fracción insoluble con el resto de los frutos. El fruto de palma aceitera y guanábana comparte la presencia de ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogénico y rutina y los frutos de nance y marañón coinciden con la presencia de ácido gálico y quercetina.

Para finalizar, conocer el perfil de polifenoles de cada uno de estos frutos no es suficiente para afirmar cuál extracto tendría un mejor desempeño como inhibidores del crecimiento de hongos mediante pruebas *in vitro*. Diferentes estudios han evidenciado el efecto antifúngico de polifenoles que se encontraron en este estudio como catequina, quercetina, ácido p-coumárico, rutina, ácido ferúlico, ácido gálico (Báidez *et al.*, 2006; Zabra y Pavela, 2013) y ácido clorogénico (Martínez *et al.*, 2017). Sin embargo, los polifenoles presentes en los frutos pueden contribuir, de manera individual o en conjunto, como lo afirman Neo *et al.* (2010).

Por lo tanto, si se complementa el perfil de compuestos fenólicos con la concentración total obtenida para cada fruto, se puede sugerir que el fruto de marañón, con una concentración total de aproximadamente 3472 $\mu\text{g/g}$ (sumando el contenido de la fracción soluble e insoluble), es el fruto que presenta mayor potencial antifúngico en pruebas *in vitro* posteriores. En segundo lugar, se encuentran los extractos del fruto de nance (1046 $\mu\text{g/g}$), seguido por los extractos del fruto de pitahaya roja (462 $\mu\text{g/g}$), guanábana (400 $\mu\text{g/g}$), palma aceitera (257 $\mu\text{g/g}$) y de último lugar el jocote (218 $\mu\text{g/g}$).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

- La aplicación del método de Soxhlet como pretratamiento para eliminar las impurezas de grasas y aceites presentes en el fruto de palma aceitera resultó efectivo para remover la mayor cantidad de interferencias por estas sustancias. Con esto se logró obtener muestras fáciles de manipular para la extracción de compuestos fenólicos.
- El empleo de la técnica de liofilización para el pretratamiento de los frutos de guanábana, jocote, nance, marañón y pitahaya roja es una alternativa óptima para tratar los frutos. Esto evita la degradación de polifenoles porque no requiere el uso de altas temperaturas.
- La validación del método analítico para el análisis de identificación y cuantificación de polifenoles en los frutos en estudio permitió confirmar que la metodología analítica es apta para el uso previsto y que los resultados que genere son exactos, precisos y confiables.
- La obtención de extractos de polifenoles a partir de los frutos de palma aceitera, guanábana, nance, marañón, jocote y pitahaya roja basada en un mismo método (Lux *et al.*, 2020), permitió extraer compuestos fenólicos presentes en fracciones solubles e insolubles en cada fruto.
- Se observaron similitudes en el perfil de polifenoles entre los frutos de nance y marañón; entre guanábana y jocote y palma aceitera y un perfil muy diferente y particular en el contenido de polifenoles en la pitahaya roja.
- Se demostró que los polifenoles que predominaron en el fruto de palma aceitera fueron: ácido ferúlico, ácido clorogénico, quercetina, rutina y ácido 4-hidroxibenzoico.

- Se estableció que los polifenoles que predominan en el fruto de marañón son ácido gálico, quercetina y ácido ferúlico.
- Se determinó que para el fruto de nance los polifenoles que predominan son ácido gálico, quercetina, ácido 5-o-cafeolquínico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido clorogénico/ácido vanílico.
- Se identificaron y cuantificaron los polifenoles de ácido siríngico, ácido gálico, ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico/ácido elágico, ácido protocatecuico, ácido 5-o-cafeolquínico y rutina en el fruto de guanábana.
- Se identificaron y cuantificaron los polifenoles de ácido clorogénico/ácido vanílico, ácido cafeico, ácido 5-o-cafeolquínico, ácido o-coumárico, ácido p-coumárico, epigallocatequina y naringenina en el fruto de pitahaya roja.
- Los polifenoles presentes en mayor concentración en el fruto de jocote fueron el ácido siríngico y el ácido clorogénico/ácido vanílico.
- En esta investigación se determinó que el fruto con mayor contenido de compuestos fenólicos y que, por lo tanto, es posible que presente mejor potencial antifúngico es el marañón (3472 µg/g), seguido del nance (1046 µg/g), pitahaya roja (462 µg/g), guanábana (400 µg/g), palma aceitera (257 µg/g) y de último lugar el jocote (218 µg/g).

6.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que, en próximos pretratamientos de la palma aceitera, se amplíe el tiempo de extracción con el método de Soxhlet a un mínimo de 8 horas. Esto porque es el tiempo recomendado para extracciones cuando se usa hexano como solvente.
- Se recomienda que para evitar la coelución de los estándares de polifenoles de ácido clorogénico/ácido vanílico y ácido ferúlico/elágico, usar la técnica de HPLC acoplado al detector de masas para una mejor

detección. Otra alternativa es utilizar otro tipo de columna cromatográfica que permita mejorar la resolución de los picos.

- Se recomienda ampliar la cantidad de estándares de polifenoles disponibles para análisis de perfil de estos compuestos. Esto se debe a que no fue posible la identificación de picos con áreas considerables en los frutos de palma aceitera, guanábana y pitahaya roja. Se puede usar un detector de masas de alta resolución para realizar búsquedas no dirigidas que permitan identificar fragmentos de masas y con esto saber qué estándares se pueden adquirir adicionalmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasa, A.; Adelusi, O.; Fru, F.; Areo, M. y Njobeh, P. (2022). *Preliminary Screening of Toxicogenic Fungi and Mycotoxin Contamination: A case of Agricultural Products in Ivory Coast*, *Food Chemistry Advances*. 100132.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100132>
- Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S. y Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688-1713.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Aguilar, G.; García, M.; Vivar, M.; Guadalupe, S.; Sánchez, J.; Morales, J.; Anaya, L. y Montalvo, E. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Annona muricata* by-products and pulp. *Molecules*, 24, 904; DOI:10.3390/molecules24050904
- Alvarado, M. (2015). *Identificación de actividades antitumorales y quimiopreventivas en compuestos polifenólicos y sus conjugados nanoestructurados en un modelo de leucemia linfoblástica tipo T*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio del Sibdi-UCR. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/2984>
- Araya, C. (2004). *Estadística para laboratoristas químico* (1.^a ed.). Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- ASD Costa Rica. (2020). *Manual: Guía de variedades y clones*. http://www.asd-cr.com/images/PDFs/PROMOCIONALES/ASDManual_Varietas_espa%C3%B1ol_300320.pdf
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* 2(3), 119-145. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Barral, B.; Chillet, M.; Minier, J.; Lechaudel, M. y Schorr Galindo, S. (2017).

Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. *Fungal Biology*, 121, 1045-1053. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29122176/>

Bauce, G. (2000). A Propósito del Análisis Estadístico. *Revista de la Facultad de Medicina*, 23(1), 24-27.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692000000100005&lng=es&tlng=es

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.*, 56(11):317-33. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.

Broinizi, P.; Silva de Andrade, E.; de Oliveira y Silva, A.; Novoa, A.; Torres, R.; Cordeiro, H.; Alves y Mancini, J. (2007). Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Naturally Contained in By-products of the Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.). *Food Science and Technology*, 27(4), 902-908. <https://www.scielo.br/j/cta/a/QZ7WS8tbrNDphJrCnJyG5wJ/abstract/?lang=en>

Cabrera-Soto, L.; Salinas-Moreno, Y.; Velázquez-Cardelas, G. y Espinosa, E. (2009). Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia*, 43(8), 827-839.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140531952009000800006

Cáceres, A. (2004). *Programa Nacional de Fruta del Salvador: Guía Técnica del Cultivo del Marañón* (1.ª ed.). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <https://books.google.co.cr/books?id=C8sOA-QAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Carvalho, D. D. C.; Alves, E.; Barbosa Camargos, R.; Ferreira Oliveira, D.;

- Soares Scolforo, J. R.; de Carvalho, D. A. y Sâmia Batista, T. R. (2011). Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Ibero-American Journal of Mycology*, 28(4), 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.05.001>
- Castillo-Aguilar, B. y González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&tlng=es.
- Coche de Juan, J. A. (2008). *Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos*. Google Books. https://books.google.co.cr/books?id=4u9O5JXQf3wC&dq=espectrometr%C3%ADa+de+masas+concepto+pdf&source=gbs_navlinks_s
- Cortés, H. (2019). *Determinación del efecto del procesamiento sobre el contenido de compuestos bioactivos, capacidad antioxidante (ORAC) y el perfil de compuestos polifenólicos del jugo de Huiscoyol (Bactris Guineensis)*. [Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica]. Repositorio del Sibi-UCR. <http://hdl.handle.net/10669/80862>
- Coto, K. (2017, 30 de mayo). *Detectan contaminación de granos con micotoxinas que causan cáncer*. Universidad de Costa Rica. <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2017/05/30/detectan-contaminacion-de-granos-con-micotoxinas-que-causan-cancer.html>
- Emmanuelle, D.; Joseph, D.; Victor, A. y Mohamed, M. S. (2016). A review of cashew (*Anacardium occidentale*, L.) apple: Effects of processing techniques, properties and quality of juice. *African Journal of Biotechnology*, 15(47), 2637-2648. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14974>

- Engels, C.; Gräter, D.; Esquivel, P.; Jiménez, V. M.; Gänzle, M. G. y Schieber, A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea*, L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, 46(2), 557-562. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.003>
- Esquivel, P.; Stintzing, F. C. y Carle, R. (2007). Phenolic Compound Profiles and their Corresponding Antioxidant Capacity of Purple Pitaya (*Hylocereus* sp.) Genotypes. *Zeitschrift für Naturforschung, C.*, 62(9-10), 636-644. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-9-1003>
- Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP 43 y NF38. (2021). (621) *Chromatography*. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_1_en-US?source=TOC
- Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 43 y NF38. (2021). <1225> *Validation of compendial procedures*. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_en-US?source=TOC
- Farmacopea Europea. Supplement 10.8. (2022). 2.2.43 *Mass Spectrometry*. <https://pheur.edqm.eu/app/10-8/content/default/20243E.htm>
- Fernández, J. (2001). *La estadística en química analítica*. <https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/27822/1/2001Estad%C3%ADstica%20en%20QA.pdf>
- Forero Hernández, D.; Martínez, P.; Caicedo, L. y Romero, R. (2012). *Generalidades sobre la morfología y fenología de la palma de aceite* (H. M. Romero, ed.). Centro de Investigaciones en Palma de aceite.

<https://repositorio.fedepalma.org/bitstream/handle/123456789/107644/Generalidades%20sobre%20la%20morfolog%C3%ADa%20y%20fenolog%C3%ADa%20de%20la%20palma%20de%20aceite.pdf?sequence=1>

Fратиани, F.; Cardinale, F.; Cozzolino, A.; Granese, T.; Albanese, D.; Di Matteo, M.; Zaccardelli, M.; Coppola, R. y Nazzaro, F. (2014). Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *Journal of Functional Foods*, 7, 551-557. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.030>

García, E.; Fernández, I. y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de FolinCiocalteu*. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>

Hu, B.; Liu, X.; Zhang, C. y Zeng, X. (2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.004>

Ignat, I.; Volf, I. y Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds un fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, (4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

International Conference on Harmonisation (ICH). (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

Irías-Mata, A.; Jiménez, V. M.; Steingass, C. B.; Schweiggert, R. M.; Carle, R. y Esquivel, P. (2018). Carotenoids and xanthophyll esters of yellow and red nance fruits (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) from Costa Rica. *Food*

Research International, 111, 708-714. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.063>

Jiménez, Q. (2001). *INBio-Spondias purpurea*. CRBio.

<http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Spondias%20purpurea>

Jiménez, V. M.; Gruschwitz, M.; Schweiggert, R. M.; Carle, R. y Esquivel, P. (2014). Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*, 65, 42-46.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.051>

Jurado, B.; Aparcana, I.; Villarreal, L.; Ramos, E.; Calixto, M.; Hurtado, P. y Acosta, K. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana*, L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(3), 272-279.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000300003&lng=es&tlng=es.

Ledezma, P. B. (2004). *Aflatoxinas*. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43446404>

López, E.; Navarro, A.; Manchón, N. y Herrera, J. (2014). Compuestos funcionales en Nance (*Byrsonimacrassifolia* (L.) Kunth). *Cuerp Académi*, 2, 6-22. https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencia%20Agropecuarias%20TII/Articulo_2.pdf.

Lux, P. E.; Freiling, M.; Stuetz, W.; von Tucher, S.; Carle, R.; Steingass, C. B. y Frank, J. (2020). (Poly)phenols, Carotenoids, and Tocochromanols in Corn (*Zea mays*, L.) Kernels As Affected by Phosphate Fertilization and Sowing Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(2), 612-

622. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07009>

- Maldini, M.; Montoro, P. y Pizza, C. (2011). Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia*, L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.032>
- Mandal, S. M.; Chakraborty, D. y Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359-368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Marc, A.; Ange, K. D.; Achille, T. F. y Georges, A. (2012). *Phenolic profile of cashew apple juice (Anacardium occidentale, L.) from Yamoussoukro and Korhogo (Côte d'Ivoire)*. Elewa.org.
<http://m.elewa.org/JABS/2012/49/3.pdf>
- Marc, A.; Fabrice Ac, T.; Mory, G.; Niaba Koff, P. V. y Georges, A. N. (2011). Minerals Composition of the Cashew Apple Juice (*Anacardium occidentale*, L.) of Yamoussoukro, Cote D'ivoire. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12), 1109-1114. <https://doi.org/10.3923/pjn.2011.1109.1114>
- Martín Gordo, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81-104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Martínez, G.; Regente, M.; Jacobi, S.; Del Río, M.; Pinedo, M. y De la Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 30-35.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.012>
- Meireles, A. (2008). *Extracting Bioactive Compounds for Food Products, Chapter 4: Low-Pressure Solvent Extraction (Solid-Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants*. <https://doi.org/10.1201/9781420062397>

- Mercado-mercado, G.; Carrillo, L.; Wall-Medrano, A.; López, J. y Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria*, 28(1), 36-46. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Miller, J. y Miller, J. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson Educación.
- Mínguez, M. (2022, 10 de setiembre). *Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples colorantes naturales*. Agrocsic. https://digital.csic.es/bitstream/10261/5754/1/IG_AGROCSIC_4.pdf
- Morales, F. (2001). *INBio-Hylocereus costaricensis*. CRBio. <http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/species/Hylocereus%20costaricensis>
- Muhialdin, B. J.; Hassan, Z. y Saari, N. (2018). In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products. *Annals of Microbiology*, 68(9), 557-567. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1363-x>
- Navarro-Hoyos, M.; Moreira-González, I.; Arnáez-Serrano, E.; Murillo-Masís, R.; Rivera-Méndez, W.; Zamora-Ramírez, W.; Saravia-Arguedas, A. y Vargas-Huertas, F. (2014). Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(1), 3. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i1.3060>
- Neo, Y. P.; Ariffin, A.; Tan, C. P. y Tan, Y. A. (2010). Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. *Food Chemistry*, 122(1), 353-359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.046>
- Neo, Y. P.; Azis, A.; Tan, C. P. y Tan, Y. A. (2008). Determination of oil palm

fruit phenolic compounds and their antioxidant activities using spectrophotometric methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(10), 1823-1837. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01717.x>

Núñez-Moreira, R.; Quintana, L.; Gutiérrez-Cuesta, R.; Valdês, O.; González, K. L.; Hernández, Y.; Acosta, Y. y Ortiz, E. (2019). Optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 109-117. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.74552>

OECD-FAO. (2018). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027 cereals*. Organization for Economic Cooperation and Development-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Paris. https://www.fao.org/3/i9166e/i9166e_Chapter3_Cereals.pdf

Orak, H. H.; Bahriseft, I. S. y Sabudak, T. (2019). Antioxidant Activity of Extracts of Soursop (*Annona muricata*, L.) Leaves, Fruit Pulps, Peels, and Seeds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 359-366. <https://doi.org/10.31883/pjfns/112654>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021, 05 de mayo). *Manual Sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de control (APPCC) en la Prevención y control de las Micotoxinas*. <http://www.fao.org/3/y1390s/y1390s00.htm#Contents>

Parzanese, M. (2022, 16 de setiembre). *Tecnologías para la industria Alimentaria. Liofilización de alimentos*. Ficha n.º 3. Alimentos Argentinos. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf

Pérez, C.; González, L.; Colón, A.; Morello, C.; Mujica, V. y Martínez, A. (2009).

Evaluación comparativa de los rendimientos obtenidos mediante el proceso de extracción en aceites vegetales a partir de semillas oleaginosas. *Anales de la Universidad Metropolitana*, 9(2), 181-206. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3624078>

Porras-Loaiza, A. y López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 3(1), 121-134. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)

Queiroz, C.; Ribeiro da Silva, A.; Mendes, L.; Fialho, E. y Valente, V. (2011). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chemistry*, 125, 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.048>

Quiñones, M.; Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es.

Ramírez, J. (2007). Liofilización de alimentos. *ReCiTeIA*, 6(2), 1-39. https://www.academia.edu/25497591/Liofilizaci%C3%B3n_de_alimentos

República de Costa Rica. (1999, 20 de julio). *Decreto 27980 nivel máximo de aflotoxinas en el maíz (Zea mays); el arroz (Oryza sativa); el frijol (Phaseolus vulgaris); el trigo (Triticum aestivum) y otros cereales, oleaginosas y leguminosas*. Diario Oficial La Gaceta N140.

Rubio, D. (2009). *Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida acoplado a detección por arreglo de diodos para la cuantificación de residuos de Nicarbazina*.

<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131108/Desarrolloyvalidaci%C3%B3ndeunm%C3%A9tododecromatograf%C3%ADal%C3%ADquida-acoplado-a-detecci%C3%B3n-por-arreglo-de-diodos-paralacuantificaci%C3%B3n-de-residuos-denicarbazina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Sabino, J. (2017). *Informe final: Caracterización fitoquímica de diferentes especies de jocote (Spondias spp.) de Guatemala, para el desarrollo de productos con potencial nutracéutico*. <https://fondo.senacyt.gob.gt/portal/images/yootheme/48-2017.pdf>

Saborío, D. (2012). *Caracterización Físicoquímica de frutos de árboles promisorios de marañón (Anacardium occidentale, L.) en la región Pacífico Central de Costa Rica*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-1565.pdf>

Samapundo, S.; Demeulenaer, B.; Oseinimo, D.; Lamboni, Y.; Debevere, J. y Devlieghere, F. (2007). ¿Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasión and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, 24(5), 465-473. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.10.003>

Sanabria, L.; Martínez, J. y Baena, Y. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 202-219. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67956>

Sánchez, M.; Pachón, H.; Ortiz, D.; Corre, J. y Larrahondo, J. (2012). Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata*, L.): una revisión bibliográfica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 111-126. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622734002>

- Santillán, R.; Rodríguez, G.; Fernández, S.; Vázquez, G.; Montero, J. y Benítez, J. (2017). Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública? *Revista digital Universitaria*, 18(6). <http://revista.unam.mx/>
- Schweiggert, R. M.; Vargas, E.; Conrad, J.; Hempel, J.; Gras, C. C.; Ziegler, J. U.; Mayer, A.; Jiménez, V.; Esquivel, P. y Carle, R. (2016). Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry*, 200, 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.038>
- Shahidi, F. (2001). *Extract and Measurement of Total Lipids*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 7, D1.1.1-D1.1.11. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fad0101s07>
- Skoog, D.; West, D.; Holler, F. y Crouch, S. (2014). *Fundamental of analytical chemistry*. 9 edition. Cengage Learning.
- Suárez, O. (2007). Aplicación del análisis factorial a la investigación de mercados. Caso de estudio. *Scientia Et Technica*, 13(35), 281-286. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84903549.pdf>
- Tacán Pérez, M. (2007). *Caracterización agromorfológica e identificación de zonas potenciales de conservación y producción de guanábana (*Annona muricata*) y chirimoya (*Annona cherimola*) en fincas de agricultores y condiciones ex situ en Costa Rica*. [Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica]. Repositorio institucional Catie. <http://hdl.handle.net/11554/775>
- Technoserve. (2009). *Manual técnico de palma africana*. <https://palma.webcindario.com/manualpalma.pdf>
- Telles, A. C.; Kupski, L. y Furlong, E. B. (2017). Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. *Food Chemistry*, 214, 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.079>

- U.S. Food and Drug Administration. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. Center for Drug Evaluation and Research. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
- Urrutia, J. y Palomino, R. (2010). Componentes principales en la determinación de estaciones con patrones homogéneos de temperatura en el chocó. *Scientia et Technica*, 16(45), 257-262. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84917249047.pdf>
- Valencia, M. (2018). *Métodos de extracción de aceite esencial de la semilla de moringa (Moringa oleífera)*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Rafael Lándivar]. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjr/2018/06/17/Valencia-Maylin.pdf>
- Venegas, M. (2005). *Guía técnica del cultivo del jocote* (1ª ed.). IICA. https://books.google.co.cr/books?id=F2BE815NrLoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Zabka, M. y Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93(6), 1051-1056. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.076>
- Zamora, N. (2000). *INBio-Byrsonima crassifolia*. CRBio. <http://www.crbio.cr:8080/neoportel-web/species/Byrsonima%20crassifolia>
- Zamudio, Y. (2011). *Estudio in vitro de la capacidad inhibitoria de radicales libres del fruto de la Guanábana (Annona muricata)*. [Tesis de Maestría, Universidad Veracruzana]. Repositorio institucional. <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46954>

ANEXOS

ANEXO 1. RESULTADO DEL PRETRATAMIENTO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET Y EL PRETRATAMIENTO DE LIOFILIZACIÓN Y MOLIENDA, APLICADOS A LOS FRUTOS EN ESTUDIO

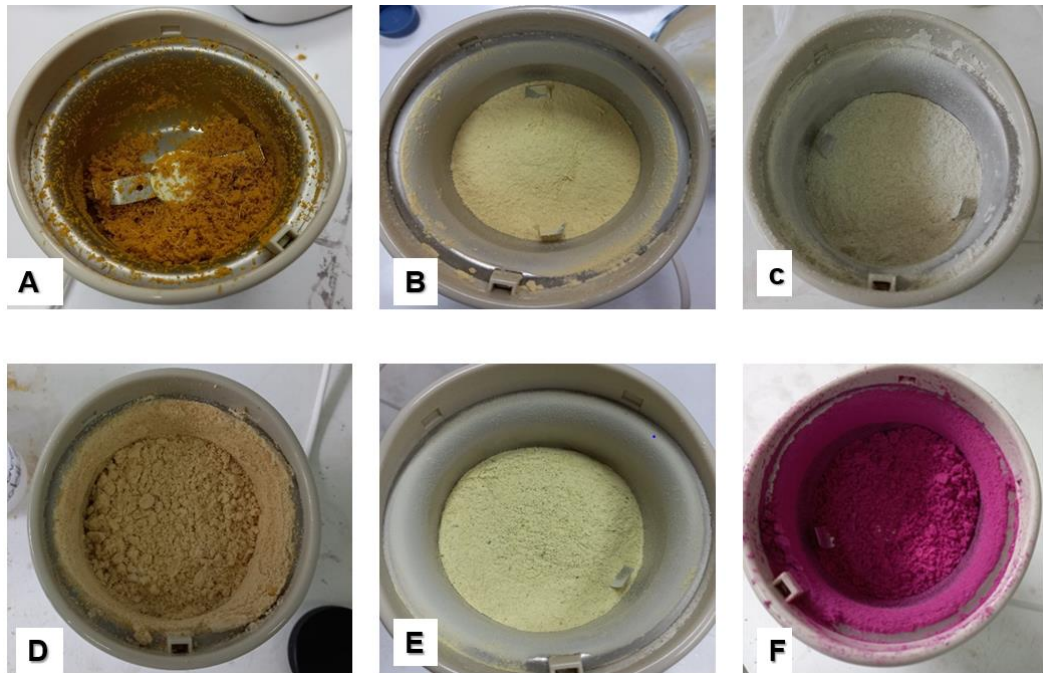


Figura 7. Resultado final del pretratamiento de los frutos con proceso de extracción con Soxhlet, secado y molienda para palma aceitera (A) y proceso de liofilizado y molienda para los frutos de marañón (B), guanábana (C), nance (D), jocote (E) y pitahaya roja (F)

ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE POLIFENÓLES OBTENIDAS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN EN LA PRUEBA DE LINEALIDAD

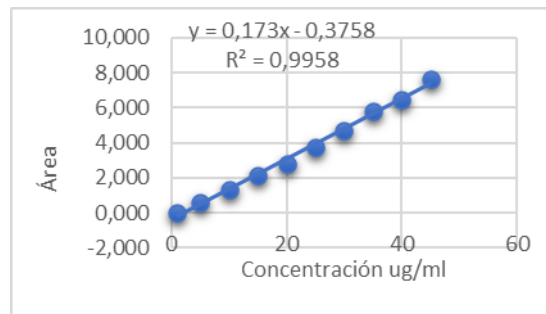


Gráfico 1. Curva de ácido protocatecuico

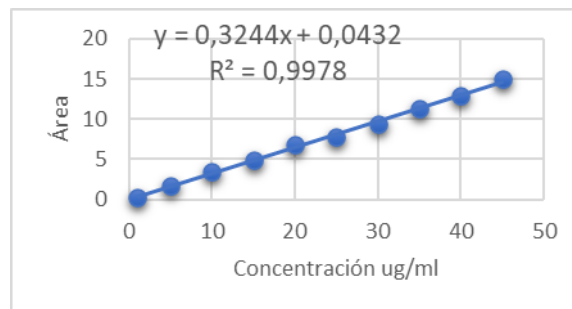


Gráfico 2. Curva de ácido cafeico

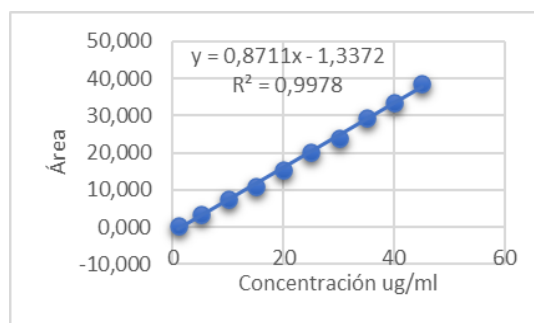


Gráfico 3. Curva de ácido siríngico

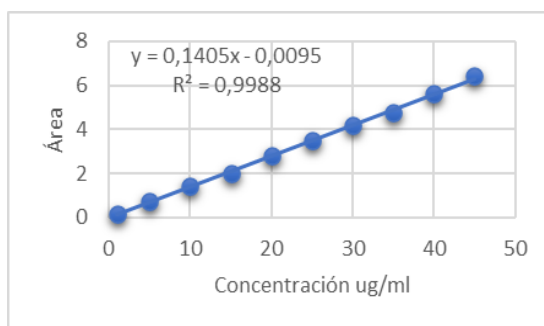


Gráfico 4. Curva de rutina

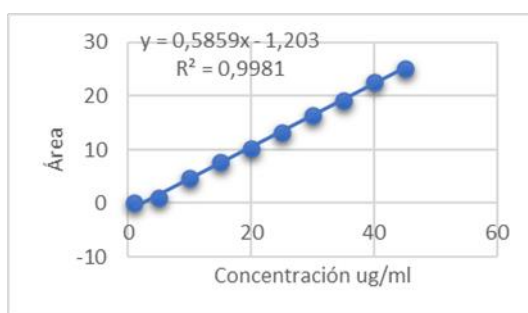


Gráfico 5. Curva de ácido ferúlico/elágico

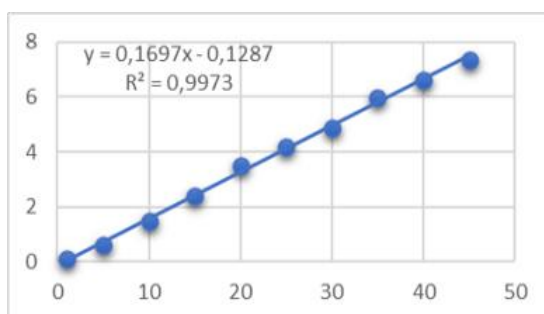


Gráfico 6. Curva de ácido clorogénico/vanílico

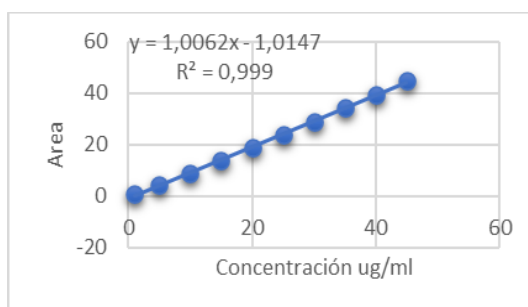


Gráfico 7. Curva de transresveratrol

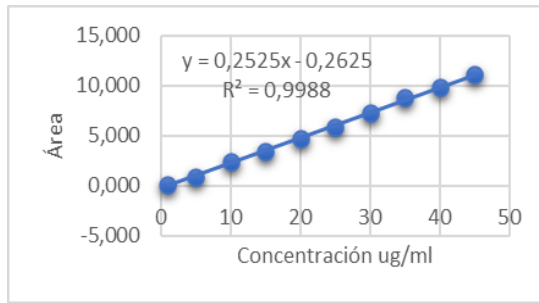


Gráfico 8. Curva de kaempferol

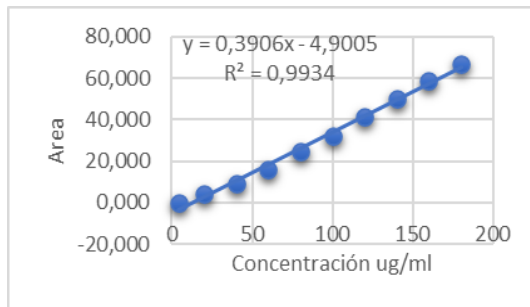


Gráfico 9. Curva de ácido gálico

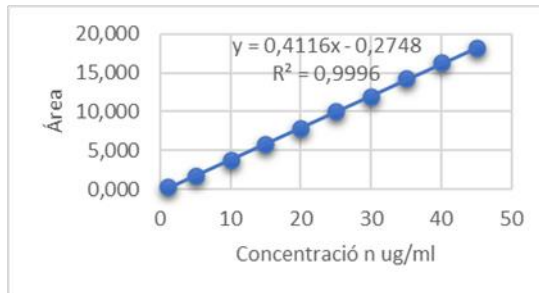


Gráfico 10. Curva de ácido 4-Hidrobenzoico

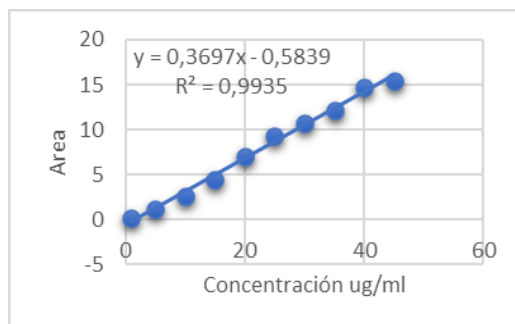


Gráfico 11. Curva de ácido 5-o-cafeolquínico

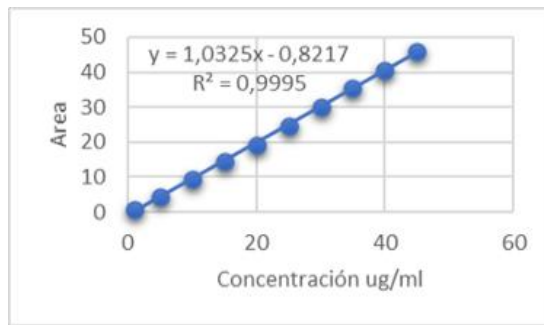


Gráfico 12. Curva de ácido p-coumárico

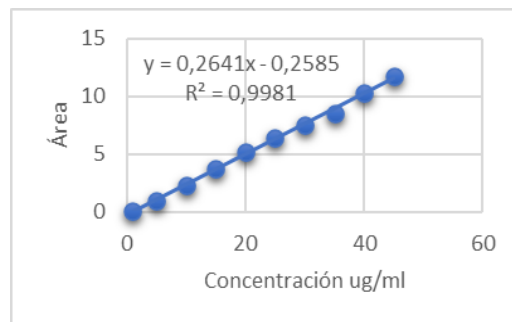


Gráfico 13. Curva de epigallocatequina

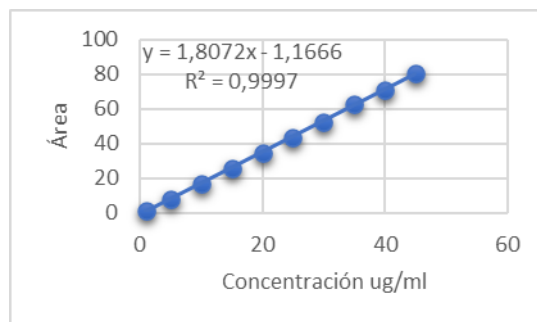


Gráfico 14. Curva de ácido o-coumárico

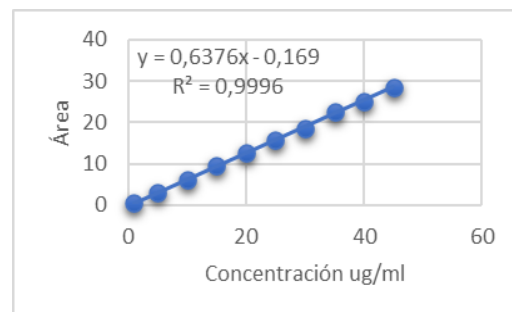


Gráfico 15. Curva de naringenina

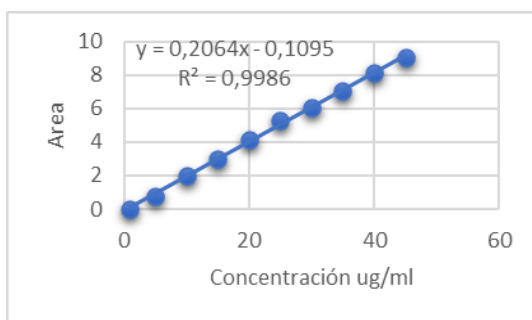


Gráfico 16. Curva de ramnetina

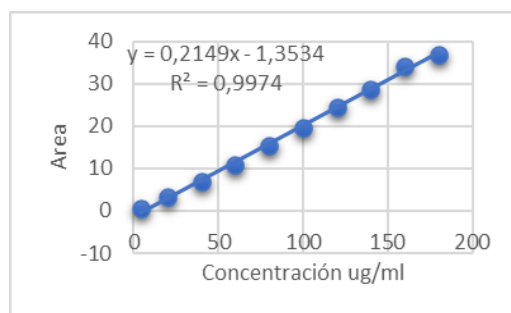
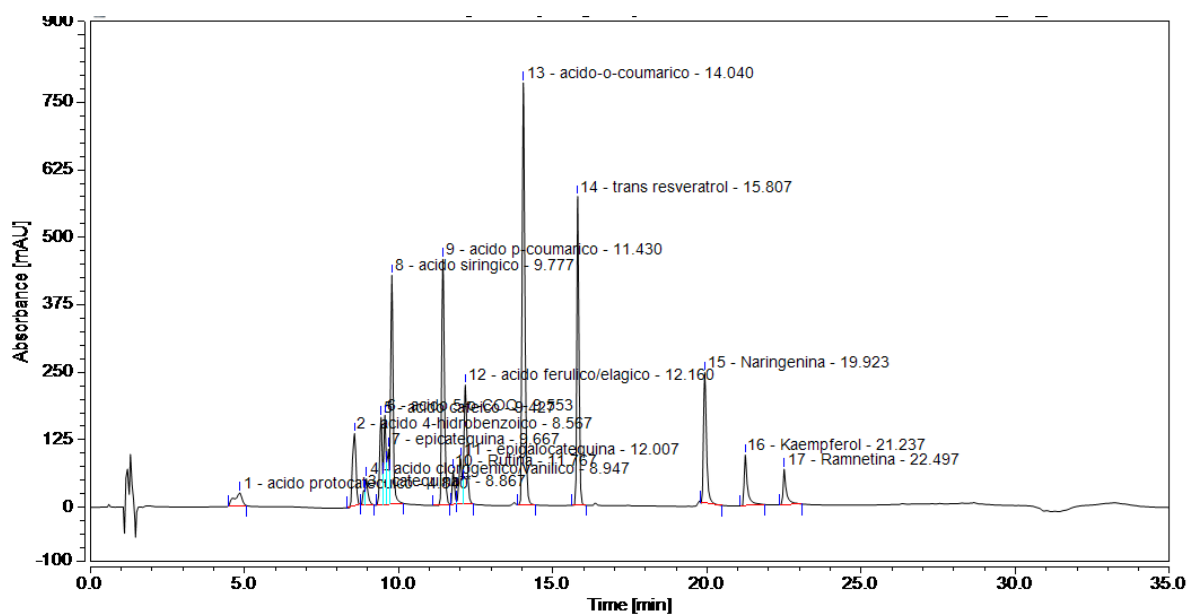
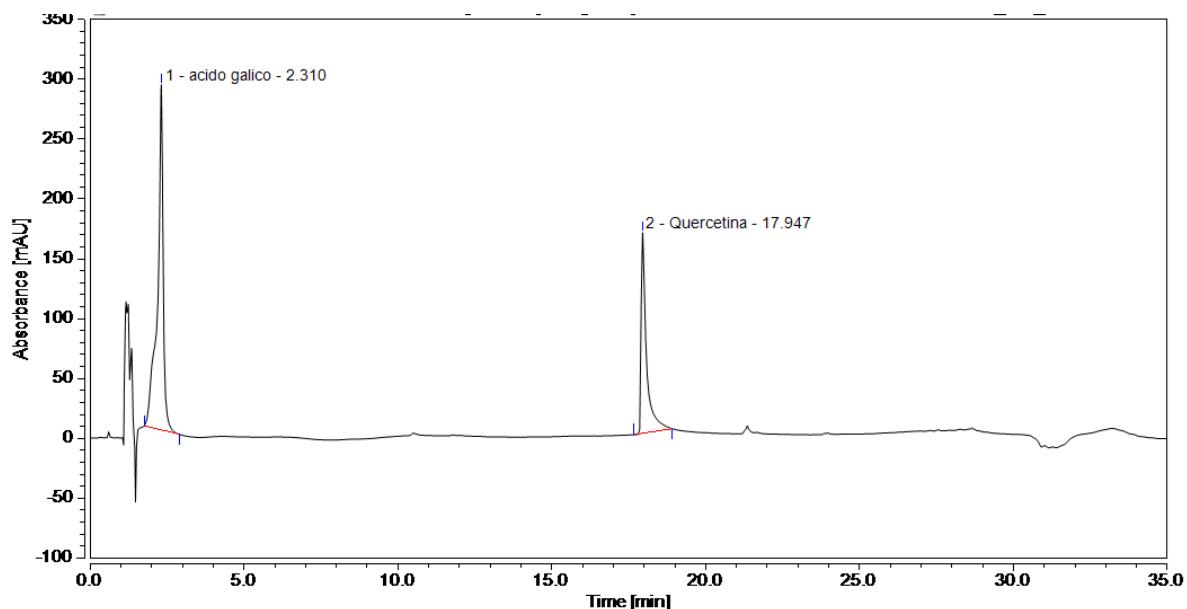


Gráfico 17. Curva de quercetina

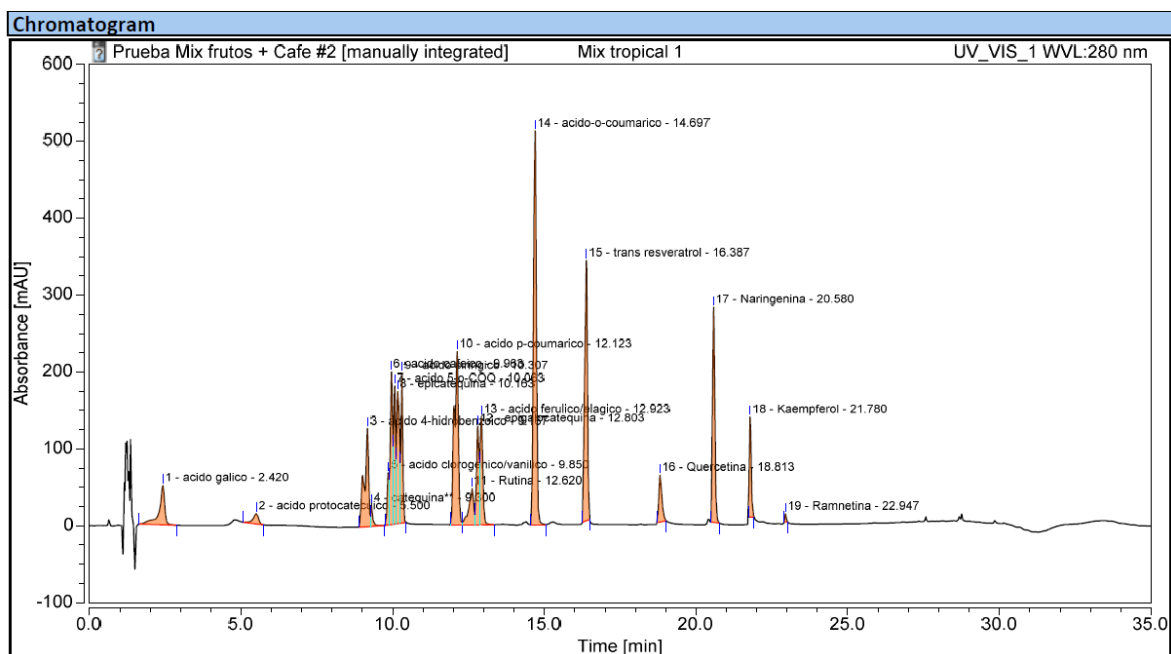
ANEXO 3. CROMATOGRAMAS DE LAS 2 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE POLIFENOLES PREPARADAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO EN EL PROCESO DE VALIDACIÓN



Cromatograma 1. Curva de calibración en un rango de 1 a 45 µg/ml llamado Mix#1, compuesto por 17 estándares de polifenoles

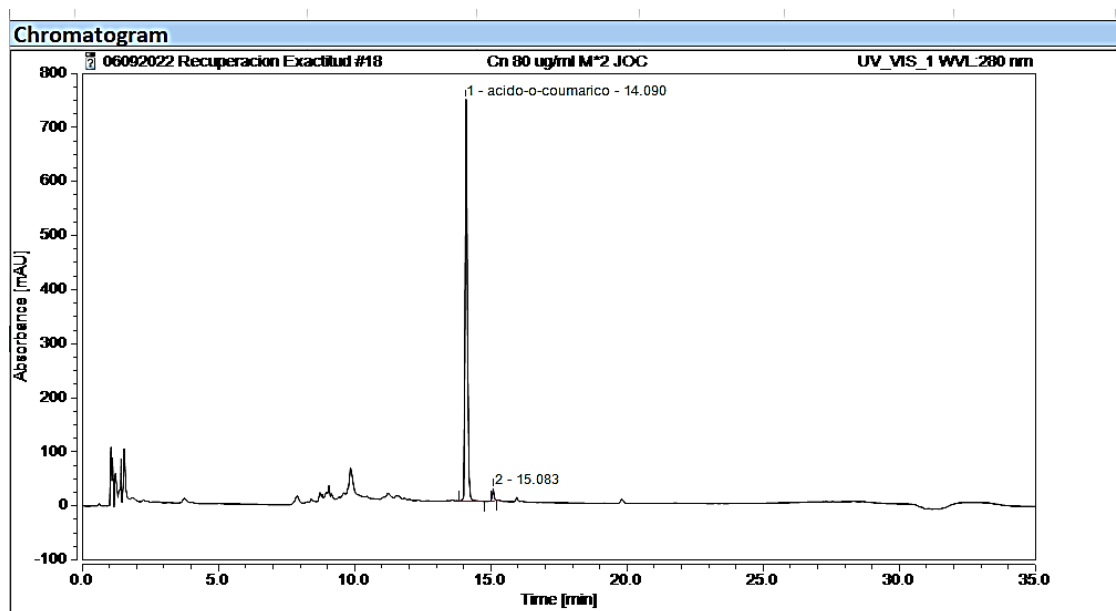


Cromatograma 2. Curva de calibración preparada en un rango de 4 a 180 µg/g denominado Mix 2, compuesto por 2 estándares de polifenoles

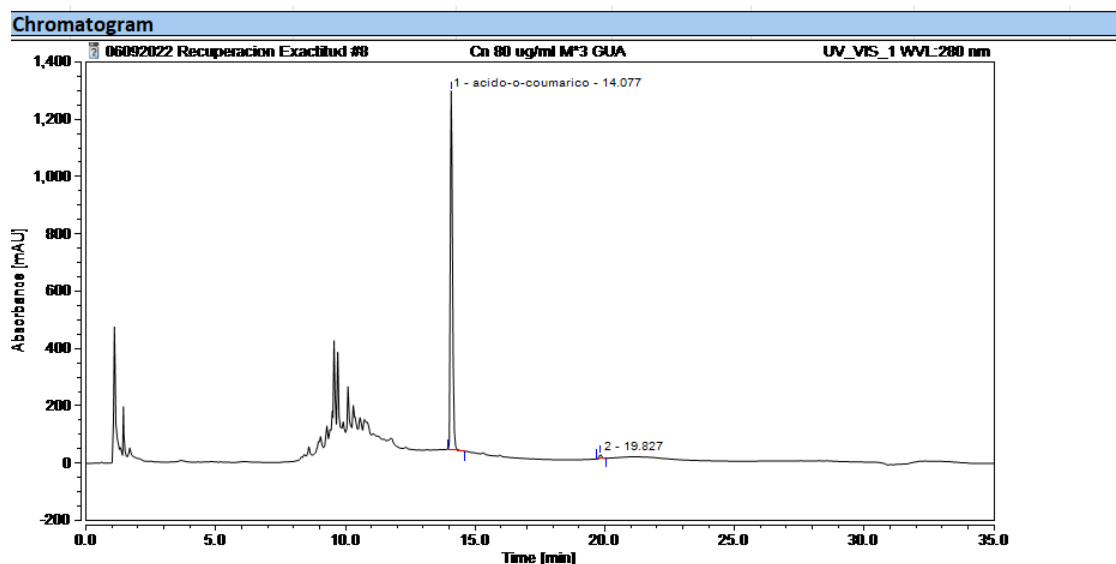


Cromatograma 3. Mezcla de estándares de polifenoles que se utilizan para identificar el tiempo de retención de cada uno para la prueba de validación de la metodología analítica

ANEXO 4. CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL ESTÁNDAR DE ÁCIDO O-COUMÁRICO PARA EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD Y RECUPERACIÓN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO

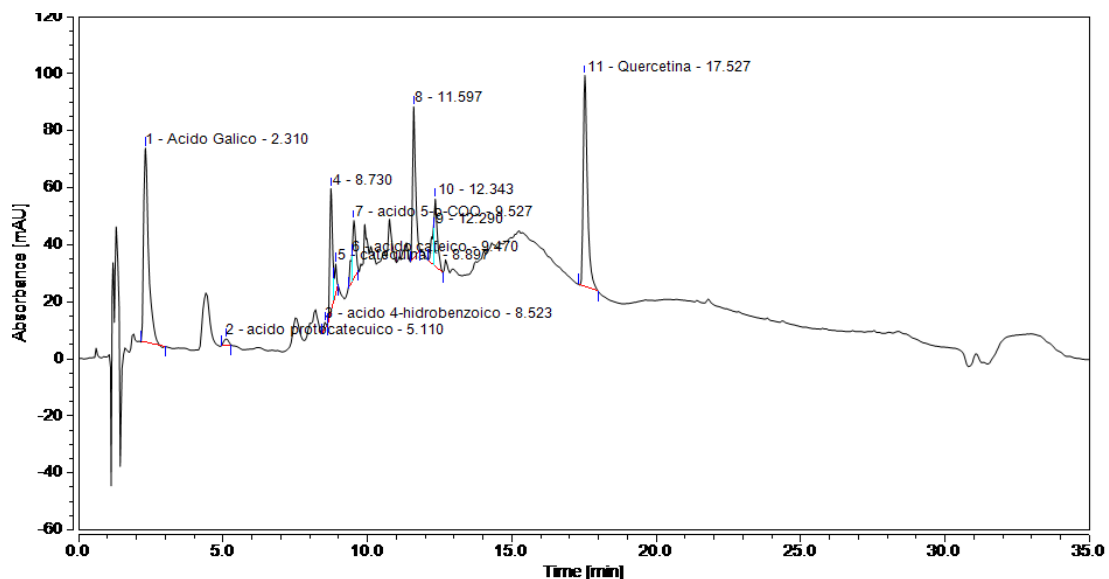


Cromatograma 4. Recuperación del estándar de ácido o-coumárico preparado a una concentración a nivel medio (80 µg/ml) en una muestra de jocote

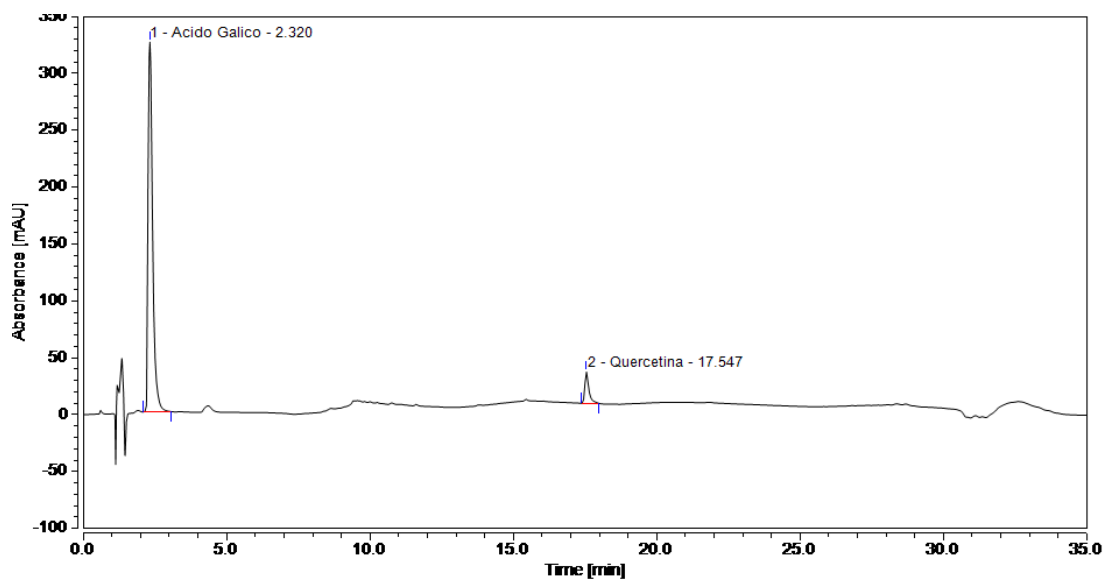


Cromatograma 5. Recuperación del estándar de ácido O-coumárico preparado a una concentración a nivel medio (80 µg/ml) en una muestra de guanábana

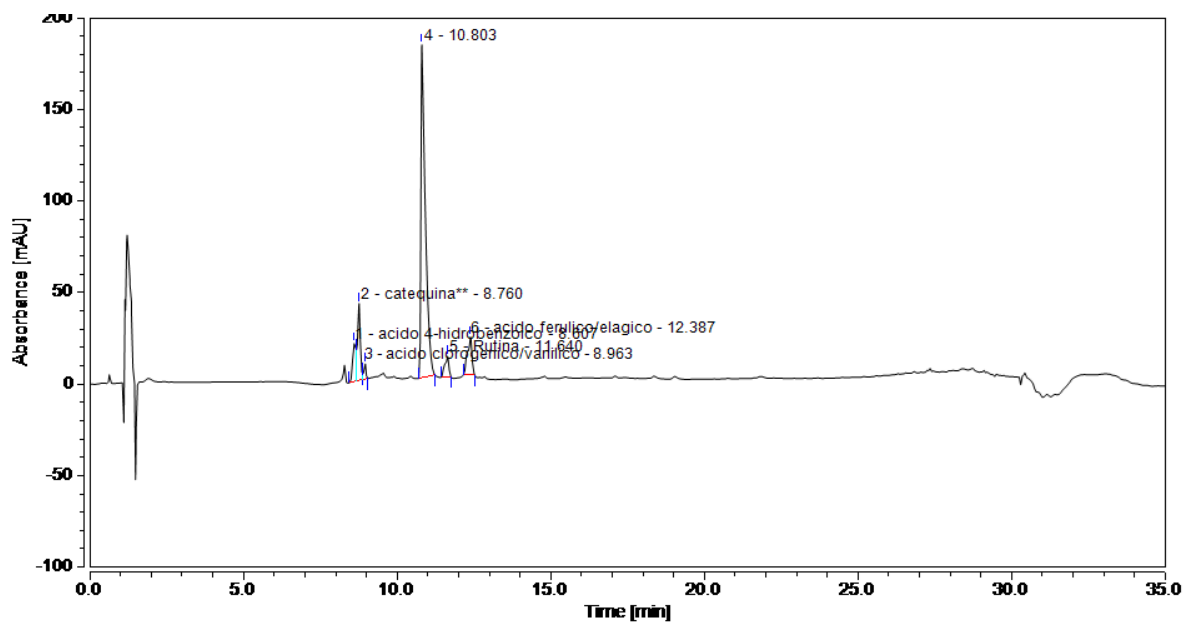
ANEXO 5. CROMATOGRAMAS DE LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LOS FRUTOS DE PALMA ACEITERA, GUANÁBANA, JOCOTE, NANCE, MARAÑÓN Y PALMA ACEITERA POR HPLC



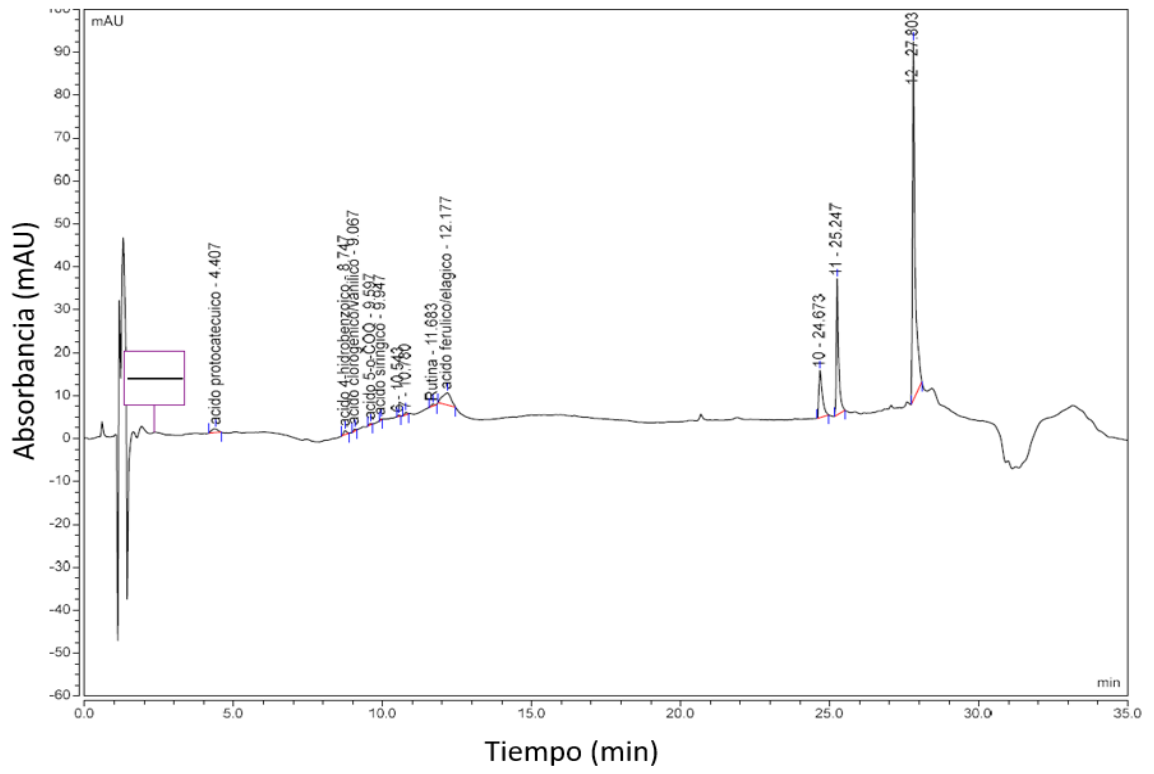
Cromatograma 6. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de nance



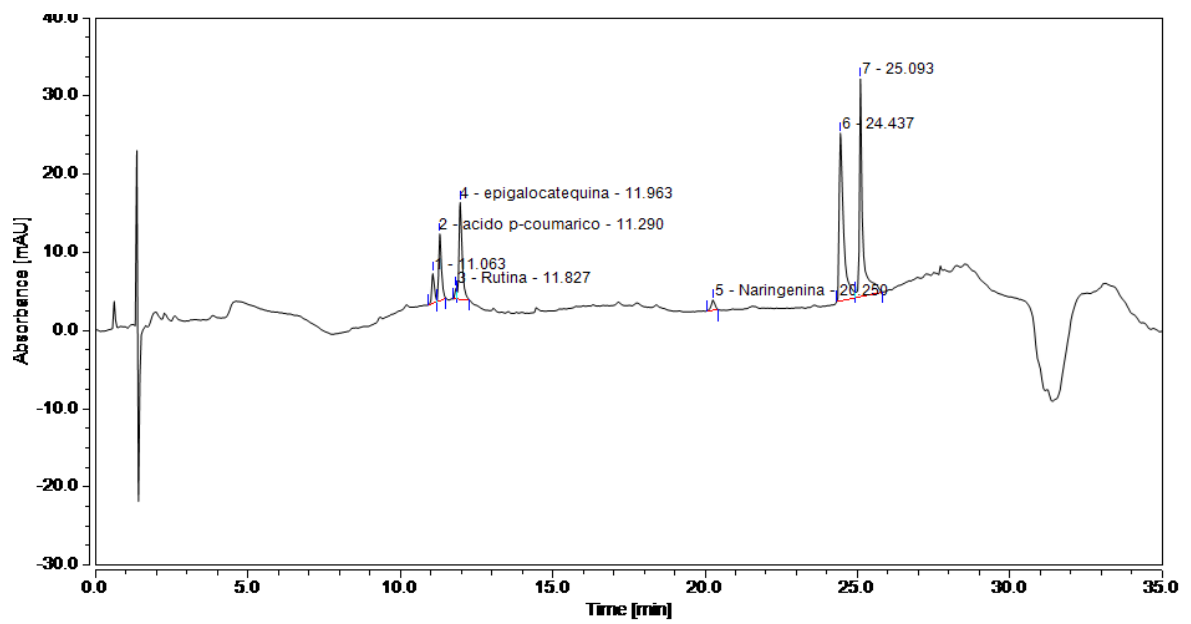
Cromatograma 7. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de marañón



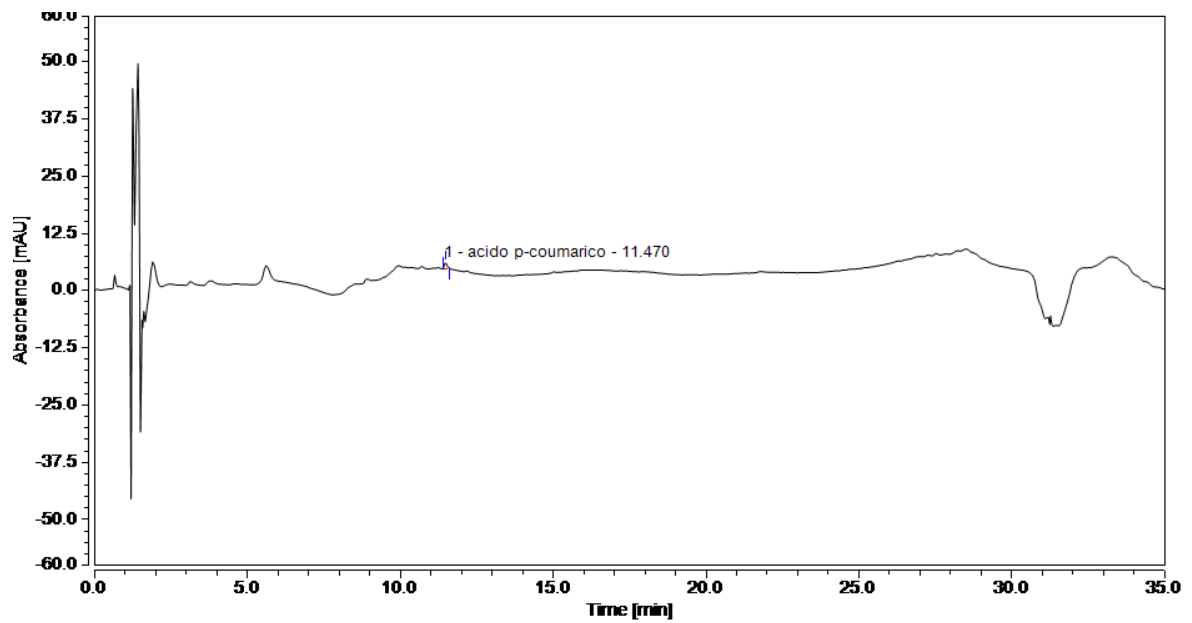
Cromatograma 8. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de palma aceitera



Cromatograma 9. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de guanábana



Cromatograma 10. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de pitahaya roja



Cromatograma 11. Muestra de la fracción insoluble de polifenoles del fruto de jocote

ANEXO 6. EJEMPLO DE APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE GRUBBS PARA LA ELIMINACIÓN DE DATOS ATÍPICO

Para el uso de la prueba de Grubbs se debe ordenar la serie de datos que se obtienen de menor a mayor, así se puede apreciar mejor si el dato que se considera sospechoso se ubica en el extremo inferior o superior del valor promedio. Con ayuda de la herramienta de Microsoft Excel, se verifica la distribución de los datos, es decir, que posean una distribución normal, en forma de campana de Gauss y se calcula el valor de T para el dato sospechoso, que lo define la Ecuación 5.

Ecuación 5. Fórmula para el cálculo de T para un dato sospechoso que se encuentre en el límite superior de los datos

$$T_{obtenido} = \frac{\text{Valor máximo} - \text{promedio (X)}}{\text{desviación estándar (S)}}$$

Si el T obtenido es mayor al T crítico proveniente de la tabla de la prueba de Grubbs, el dato se considera anómalo y se puede eliminar. En este caso, se puede observar en el extremo superior que el dato que se considera sospechoso está de color rojo (113), después se determina la distribución normal del conjunto de datos tomando en cuenta el valor promedio y la desviación estándar. Se verifica la distribución normal en forma de campana de Gauss en el gráfico adjunto y se calcula el T, el cual fue de 2,74; el T teórico para una cantidad de muestras de 20 es de 2,56. Esto se debe a que el T calculado es mayor al T teórico, se confirma que el dato sospechoso es atípico y se puede eliminar.

Rutina	Distribución N		
11	0,003590551	Grubbs	T calculado: 2,74
12	0,003931166	n: 20	T tabla: 2,56
15,59771489	0,005336523	103 dato anómalo	
18,80045135	0,006819349	promedio	48,19908562
20,89346261	0,007895642	Desviación	20,12288725
22,36362878	0,008695273		
42,24908292	0,01897732		
43,16988798	0,019215704		
45,79158419	0,01968392		
47,36105947	0,019808116		
49,06932611	0,01980677		
49,50425894	0,019783643		
49,84680192	0,019758949		
50,20208693	0,019727329		
50,48621618	0,019697659		
52,60484818	0,019355777		
54,65554788	0,018830653		
55,06372386	0,018704648		
55,20986497	0,018657873		
58,19362632	0,017524778		
79,80330445	0,00577552		
80	0,00568726		
81	0,005251216		
82	0,004836644		
83	0,004443814		
103,1152345	0,00047861		

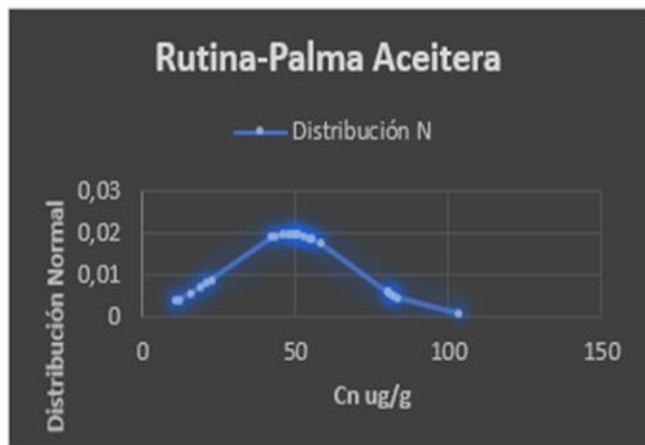


Figura 8. Aplicación de la prueba de Grubbs para la eliminación de datos atípicos del polifenol de rutina presente en la palma aceitera

CARTA DE APROBACIÓN DEL FILÓLOGO

Cartago, 23 de diciembre de 2022

Los suscritos, Elena Redondo Camacho, mayor, casada, filóloga, incorporada a la Asociación Costarricense de Filólogos con el número de carné 0247, portadora de la cédula de identidad número 3-0447-0799 y, Daniel González Monge, mayor, casado, filólogo, incorporado a la Asociación Costarricense de Filólogos con el número de carné 0245, portador de la cédula de identidad número 1-1345-0416, ambos vecinos de Quebradilla de Cartago, revisamos el trabajo final de graduación que se titula: *Determinación del perfil de polifenoles en frutos de plantas de guanábana, jocote, nance, marañón, pitahaya roja y palma aceitera nativas de Costa Rica, con potencial antifúngico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*, sustentado por Katherine Vanessa Gómez Pérez.

Hacemos constar que se corrigieron aspectos de ortografía, redacción, estilo y otros vicios del lenguaje que se pudieron trasladar al texto. A pesar de esto, la originalidad y la validez del contenido son responsabilidad directa de la persona autora.

Esperamos que nuestra participación satisfaga los requerimientos de la Universidad de Costa Rica.

ANA ELENA
REDONDO
X CAMACHO (FIRMA)
Firmado digitalmente por
ANA ELENA REDONDO
CAMACHO (FIRMA)
Fecha: 2022.12.28 22:40:16
-06'00'

Elena Redondo Camacho
Filóloga - Carné ACFIL n.º 0247

DANIEL ALBERTO
GONZALEZ
X MONGE (FIRMA)
Firmado digitalmente por
DANIEL ALBERTO
GONZALEZ MONGE (FIRMA)
Fecha: 2022.12.28 22:37:15
-06'00'

Daniel González Monge
Filólogo - Carné ACFIL n.º 0245