

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe escrito final

***Evaluación nutracéutica de los extractos crudos de Ackee (*Blighia sapida*),
colectado en la región caribeña de Costa Rica***

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar por el grado
académico de Licenciatura en Biotecnología**

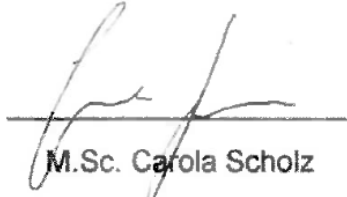
Kenny Tucker Johnson: (701440528)

Campus Omar Dengo

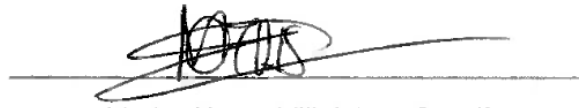
Heredia, 2023

Miembros del tribunal

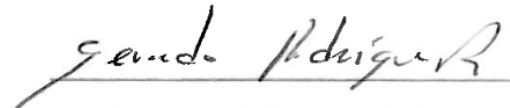
Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



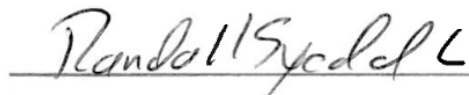
M.Sc. Carola Scholz
Representante, Decano, quién preside



Licda. Nancy Villalobos Sandí
Representante Unidad Académica



Dr. Gerardo Rodríguez Rodríguez
Tutor



M.Sc. Randall Syedd León
Asesor



Dr. Javier Alvarado Mesén
Asesor



M.Sc. Víctor Álvarez Valverde
Invitado especial

Agradecimiento

Agradezco profundamente a Dios en primer lugar quien me ha dado vida e inspirado para regresar a la universidad después de 12 años de espera por la aparición de esta licenciatura, la cual considero importante no solamente en mi formación académica, sino también integralmente, desarrollando así mi carácter y capacidad de dar respuesta en aras de ser perseverante y cumplir objetivos en la vida, dando el resultado particular de ser el único de toda mi generación que regresó para terminar lo que gracias a Dios había iniciado tiempo atrás. Todo esto me llena de alegría y es entonces donde me es justo y necesario agradecer a las siguientes personas. A mi amada madre, Iris Patricia Tucker Johnson una mujer llena del amor de Dios, resiliente y esforzada, única e irrepetible, quien trabajó arduamente para vernos a mi amada hermana Heilen y a mi persona avanzar por la vida venciendo obstáculos. Mi hermana Heilen Luisa Tucker Johnson, mi mejor amiga en vida, como dice la canción “años atrás recuerdo cuanto sufrimos...pero a pesar de todo, teníamos que estudiar”. De igual forma, quiero agradecer a mi amada Abuela materna Silvia Nodicia Johnson Forbes que en paz descansa, y mi amada tía Emilce Lorena McFarlane Johnson, estas mujeres que junto con mi amada madre marcaron mi vida, mostrándome un camino de actitud correcta, de no rendirme jamás cuando el propósito es verdadero, bueno y justo. Todo esto, a través del buen ejemplo que nos mostraron y en donde la pobreza extrema y las injusticias no pudieron detenerlas a ellas porque vivían agarradas de los principios y valores que Dios diseñó y añadió a sus vidas. A mi prima Fritcy Cecilia Tucker Díaz quien fue fundamental en el tema de las muestras para esta investigación, ella fue servicial desde el día uno y eso no será olvidado. No podría dejar por fuera de este agradecimiento a mi amado padre terrenal, Dornal Alfonso Mc Calla Davis, su existencia y sus luchas me mostraron que trabajar arduamente no es algo negociable y que el amor de Dios es infalible, diga lo que diga el ser humano. Gracias por existir Papá, que alegría saber que estas y eres salvo.

Quiero agradecer a mi tutor el PhD. Gerardo Rodríguez Rodríguez quien asumió el reto de guiarme en medio de esta investigación con su vasta experiencia y capacidad, así como el gran aporte del M.Sc. Víctor Álvarez Valverde quien, con un liderazgo, amor por la ciencia siempre quiso aportar en el avance experimental de esta investigación, así como estudiantes asistentes, compañeros y compañeras que estuvieron presentes y que juntos nos volvimos un equipo de

trabajo de calidad en el Laboratorio de Fitoquímica (LAFIT), cada aporte, directo e indirecto sumó para completar la tarea.

A mis asesores, a quienes considero a la vez mis amigos, pues me conocen y me han servido generando en mí una reciprocidad valiosa, el M.Sc. Randall Syedd León, un amigo como muy pocos, quien ha sido fundamental dentro y fuera de tiempo, poseedor por gracia, de unos principios superiores que lo convierten en un servidor que mejora día a día, con una capacidad distinguida en el área de la química, tendría que hacer una tesis aparte para agradecerle debidamente, gracias “Brop”. A mi estimado amigo, Dr. Javier Alvarado, son muchas las historias desde residencias universitarias al día de hoy, no imaginé que serías uno de mis asesores, y una persona que me estima y respeta auténticamente, siempre con las palabras acertadas para impulsarme al más alto nivel en la ciencia y en lo empresarial.

Quiero así, agradecer a Pilar Vargas Rodríguez por ser una amiga fiel al origen, leal en todo momento desde el primer día en que nos conocimos, ella es diferente sin duda alguna y su ayuda es parte de mi legado. Y de esta manera cierro mis agradecimientos con una persona apasionada por la ciencia y la investigación, emprendedor y un profesional que aporta soluciones en la biotecnología costarricense, me refiero al M.P.M. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez quien me ayudó en gran manera con su especialidad y línea de investigación como lo es la biotecnología microbiana, organizando y coordinando con sus estudiantes asistentes, siendo una de ellos la estudiante Ana María Ocampo Cambroner, a quién agradezco por su servicialidad y compromiso.

Dedicatoria

Dedico esta tesis al único y verdadero Dios (Jn. 17:3), creador de los cielos y la tierra (Sal.146:6), Dios de Abraham, de Isaac y de Jacob (He. 7:32), quien me ha dado propósitos para tener razón de ser y hacer, promesas para tener dirección y principios para la toma de decisiones. Todos mis talentos y dones provienen de él y como dice mi libro en proceso:

“Dios es todo, y sin él, todo es nada.” (Kenny Tucker Johnson, 2018)

Índice

<i>Miembros del tribunal</i>	<i>I</i>
<i>Agradecimiento</i>	<i>II</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>IV</i>
<i>Índice</i>	<i>V</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>VII</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>VIII</i>
<i>Abreviaturas y símbolos</i>	<i>X</i>
<i>Resumen</i>	<i>XI</i>
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.2. Justificación	4
1.3. Planteamiento del problema.....	6
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo general	6
1.4.2. Objetivos específicos	6
2. Marco Teórico	7
<i>Alimentos funcionales y sus componentes</i>	7
Origen y concepto de alimento funcional.....	8
Alimentos funcionales con propiedades antioxidantes	9
<i>Antioxidantes</i>	10
Modo de acción de los antioxidantes	10
<i>Antibióticos naturales</i>	11
Modo de acción de los antibióticos	11
Método Kirby-Bauer para evaluación de la actividad antibiótica.....	12
Bacterias ESKAPE y su resistencia a la actividad antibiótica.....	12
<i>Métodos de análisis de metabolitos secundarios con valor nutracéutico</i>	16
Cuantificación de polifenoles totales empleando el ensayo de Folin-Ciocalteu	16
Métodos para cuantificar antocianinas	17
Métodos para cuantificar la actividad antioxidante.....	17
<i>Polifenoles</i>	18
Estructura y clasificación de los compuestos fenólicos.....	19

<i>Ackee</i>	24
Descripción botánica	24
Importancia comercial y usos etnobotánicos.....	26
Composición fitoquímica.....	26
<i>Economía Circular</i>	28
3. Marco Metodológico	30
Obtención y preparación de las muestras.....	30
Elección del disolvente para realizar la extracción de polifenoles	31
Determinación del número óptimo de extracciones sobre la muestra.....	31
Determinación del contenido de polifenoles totales	32
Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos crudos de ackee	33
Diseño de análisis de datos	34
Antibiogramas a través del método de difusión en agar por pozos utilizando las bacterias ESKAPE.....	34
Optimización de las condiciones de extracción.....	36
Contenido de polifenoles totales en <i>B. sapida</i>	40
Potencial antioxidante de <i>B. sapida</i>	41
Contenido de antocianinas totales	42
Efecto antibiótico en bacterias ESKAPE	47
5. Discusión	52
Optimización de las condiciones de extracción.....	52
Contenido de polifenoles totales en <i>B. sapida</i>	52
Potencial antioxidante de <i>B. sapida</i>	54
Contenido de antocianinas totales	55
Correlaciones entre metabolitos y su efecto antioxidante	56
Efecto antibiótico en bacterias ESKAPE.....	57
5. Conclusiones	58
6. Recomendaciones	60
7. Referencias	61
8. Anexos	72

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Clasificación de compuestos fenólicos con un anillo aromático</i>	19
Tabla 2. <i>Clasificación de compuestos fenólicos con varios anillos aromático</i>	21
Tabla 3. <i>Iniciativas públicas de economía circular en América Latina</i>	29
Tabla 4. <i>Sistema de disolventes utilizados para valorar el poder extractivo de polifenoles totales en B. sapida</i>	36
Tabla 5. <i>Relaciones estadísticas obtenidas entre las variables de análisis antioxidante en B. sapida determinadas mediante el coeficiente de Pearson R^2</i>	46
Tabla 6. <i>Actividad antibiótica medida en las bacterias ESKAPE</i>	47
Tabla 7. <i>Coefficientes de correlación de Pearson (R^2)</i>	51

Índice de figuras

Figura 1. <i>Micrografías y representaciones de las bacterias ESKAPE</i>	14
Figura 2. <i>Estructuras de algunos compuestos fenólicos mono aromáticos (C6 y C6-Cn)</i>	20
Figura 3. <i>Estructura química de los diferentes tipos de flavonoides</i>	22
Figura 4. <i>Estructura química de los diferentes tipos de flavonoides</i>	23
Figura 5. <i>Morfología del árbol de B. sapida y su fruto</i>	25
Figura 6. <i>Ubicación geográfica del sitio de colecta de B. sávida para el estudio</i>	30
Figura 7. <i>Comparación de absorciones medias de una muestra compuesta de arilos de B. sapida tratada con el método Folin-Ciocalteu para PFT con diferentes disolventes de extracción</i>	38
Figura 8. <i>Comparación de absorciones medias de una muestra compuesta de arilos de B. sapida tratada con el método Folin-Ciocalteu para PFT con diferente número de extracciones</i>	39
Figura 9. <i>Distribución de la cantidad de polifenoles totales (PFT) en B. sapida en diferentes partes de la planta determinadas por el método Folin-Ciocalteu</i>	40
Figura 10. <i>Capacidad antioxidante en las muestras de B. sapida determinadas empleando el método de ORAC</i>	42
Figura 11. <i>Distribución de la cantidad de antocianinas totales en muestras en B. sapida obtenidas por el método pH diferencial reportadas como equivalentes de cianidina 3-glucósido (C3G)</i>	43
Figura 12. <i>Tendencias en las variaciones de la capacidad antioxidante (ORAC) y los polifenoles totales (PFT) en distintas partes de la planta de B. sapida</i>	44

Figura 13. <i>Tendencias en las variaciones de la capacidad antioxidante (ORAC) y los polifenoles totales (PFT) en distintas partes de la planta de B. sapida</i>	45
Figura 14. <i>Tendencias en la respuesta antibiótica por halo de inhibición (mm) en las bacterias ESKAPE como consecuencia de la exposición a extractos de distintas partes de B. sapida de concentración 50 mg/mL</i>	48
Figura 15. <i>Resultados obtenidos en la medición del diámetro del halo de inhibición</i>	49
Figura 16. <i>Efecto antibiótico en las bacterias ESKAPE</i>	50

Abreviaturas y símbolos

AAPH	2,2'-azobis-2-metil- propanimidamida-dihidroclórico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Arilo maduro
ANOVA	Análisis de varianza
ANT	Antocianinas totales
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia
AV	Arilo verde o inmaduro
C3G	Cianidina-3-glucósido
DZI	Diámetro de la Zona de Inhibición
EC	Economía Circular
ECA	Extractos crudos de Ackee
EGA	Equivalentes de ácido gálico
ESKAPE	Acrónimo de las letras iniciales de las bacterias: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A.baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. faecium</i> .
EX	Exocarpio
FL	Fluoresceína
HO	Hojas
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
HPLC-MS	Espectrometría de masas
LAFIT	Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional
mg E C3G/gMS	Miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido por gramo de muestra seca
mg EAG/gMS	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ORAC	Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno
PACS	Proantocinidinas
PFT	Polifenoles totales
PRDZI	Porcentaje Relativo del Diámetro de la Zona de Inhibición
RL	Radicales libres
ROO·	Radicales peroxilos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1	Solvente Acetona:agua
S2	Solvente Acetona:etanol:agua
S3	Solvente Acetona:metanol:agua
S4	Solvente Etanol
S5	Solvente Metanol:agua
SD	Desviación estándar
TA	Tallo
Trolox	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UNA	Universidad Nacional
μmol ET/gMS	Micro moles equivalentes de trolox por gramo de muestra seca
μL	Microlitro(s)

Resumen

Se analizó el potencial nutraceutico de *Blighia sapida* (ackee) de diferentes partes del árbol: arilo maduro, arilo verde, hojas, tallo, y exocarpio. Se determinó el contenido de polifenoles totales (PFT), antocianinas totales (ANT), y la actividad antioxidante mediante los métodos Folin-Ciocalteu, pH diferencial y ORAC respectivamente. Por otro lado, se analizó el potencial antibiótico contra las bacterias ESKAPE (Kirby- Bauer). La parte con mayor PFT fue el exocarpio (6.107 ± 0.262 mg EAG/gMS), mientras que la de menor contenido fue el arilo maduro (1.440 ± 0.007 mg EAG/gMS). Las ANT están en mayor proporción en el arilo verde (13.130 ± 0.980 mgE C3G/gMS) siendo significativamente superior a las otras partes (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). El tallo es la parte con menor ANT (2.201 mgE C3G/gMS). Las hojas presentan las mejores propiedades antioxidantes (115.281 ± 3.334 μ mol ET/gMS) mientras que el de menor actividad es el arilo maduro (6.903 ± 0.278 μ mol ET/gMS), lo cual es parcialmente consistente con el contenido de PFT mostrando la relación entre las variables PFT y ORAC. La capacidad antioxidante es más alta en las hojas, y el exocarpio en segundo lugar (110.382 ± 1.176 μ mol ET/gMS). Pese a que las ANT son un subgrupo de los PFT, las ANT no están relacionadas significativamente con ORAC. El arilo maduro y el arilo verde, de menor a mayor, son las partes con menos efecto antimicrobiano sobre las bacterias, a diferencia del tallo y el exocarpio, los cuales presentan el mayor efecto antibiótico, sin diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$). Según los resultados, la parte de la planta de *B. sapida* con un mejor potencial nutraceutico es el exocarpio, lo cual permite generar un mayor valor agregado dado que constituye la parte del fruto que normalmente es descartado.

1. Introducción

En el campo de la producción de alimentos, la demanda de los consumidores en las últimas décadas ha cambiado considerablemente. Las personas han reconocido que es necesario una mejor dieta y que los alimentos que consumen están directamente relacionados con su salud. Los alimentos, en la actualidad no tienen la única meta de proveer nutrientes, sino para prevenir enfermedades (Medina et al., 2020). El mejoramiento sustantivo de la calidad de vida de las personas que consumen alimentos funcionales ha contribuido a revalorizar su comercialización (Meléndez et al., 2020). El conocimiento etnobotánico de los pueblos se ha ido sistematizando con el desarrollo científico; de esta manera, los recursos naturales se han constituido en una fuente de muchos de los medicamentos conocidos y comercializados. Uno de los primeros casos en llamar ampliamente la atención de la comunidad científica fue el descubrimiento del taxol, un potente anticancerígeno obtenido de la corteza de árbol de tejo (Gallego et al., 2020).

Los metabolitos secundarios presentes en diversas frutas y verduras tienen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, reguladoras de la presión arterial, antitumorales, etc., lo que ha provocado una gran investigación sobre ellos (Quintana & Paucar, 2020). Estos compuestos incluyen polifenoles, como los flavonoides, especialmente antocianinas y taninos. Los estudios *in vitro* y los datos *in vivo* demuestran cada vez más la importancia de estos metabolitos para reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con la edad (Castillo et al., 2022). Los estudios epidemiológicos han demostrado que existe una correlación inversa entre el contenido de antioxidantes en frutas y verduras y la mortalidad y morbilidad que causan en las personas enfermedad coronaria y el cáncer (Forbes et al., 2020).

Tal como se ha resaltado, los antioxidantes polifenólicos tienen una gran capacidad para reducir los radicales libres, lo cual ha incrementado el interés en ellos en la última década (Álvarez et al., 2019). En este sentido, este trabajo constituye el primer aporte de un estudio costarricense de ackee desde un enfoque bioprospectivo con el fin de determinar su potencial nutracéutico, a través del contenido de antioxidantes y su posible actividad antibiótica. Los estudios publicados hasta el momento en la literatura científica permiten identificar algunos trabajos en otras latitudes con enfoques distintos y, específicamente en Costa Rica solo fue posible identificar un trabajo para identificar las zonas de cultivo y comercialización, sin incluir el componente fitoquímico.

1.1 Antecedentes

El abordaje actual en la salud ha conllevado a un cambio de paradigma en cuanto al potencial de las plantas para producir sustancias bioactivas. En general, existe mayor conciencia sobre el uso y aprovechamiento de una gran cantidad de metabolitos secundarios naturales. En particular, el valor nutracéutico de los alimentos puede ser determinado por la presencia de estos componentes (Cano et al., 2020).

La composición de metabolitos secundarios en las plantas presenta una alta diversidad, lo cual origina muchas propiedades farmacológicas potenciales. Muchas de estas propiedades se han asociado a los polifenoles, los cuales han demostrado actividad contra ciertas formas de cáncer (Serra et al., 2020). En el campo de los antioxidantes la mayoría de los estudios se orientan hacia alimentos típicamente identificados como bayas, tales como arándanos y moras, dado que son alimentos de pigmentaciones intensas. En cuanto al ackee, los estudios disponibles en la literatura son bastante más limitados por lo que se dispone de menor información.

El ackee es un árbol que prevalece en climas subtropicales y tropicales, introducido a Jamaica en el año 1776 por Tomas Clark (Sinmisola et al., 2019). Su toxicidad está asociada al consumo del fruto inmaduro desde finales del siglo XIX, reportándose una variedad de casos caracterizados por vómitos, debilidad generalizada, pérdida de conciencia e inclusive la muerte (Sánchez, 2022). El arilo maduro del ackee es un alimento básico encontrado en África Occidental y en Jamaica por ser el fruto nacional de este país en donde para prevenir la toxicidad, las semillas y las membranas del fruto deben ser removidas cuidadosamente y lavando el arilo antes de ser consumido (Quesada & Barrantes, 2019).

Una de las características más llamativas de este fruto es que se debe ser muy cuidadoso con el periodo de consumo dado que aun estando maduro, si el exocarpio no se ha abierto existen niveles altos de hipoglicina A que pueden resultar perjudiciales para la salud. En tal sentido existen estudios que relacionan el tiempo de maduración, cosecha y consumo con el contenido de este tipo de alcaloides perjudiciales (Grande et al., 2019).

Los primeros reportes sobre su actividad biológica se dieron a conocer por las propiedades tóxicas en el fruto inmaduro. El componente causante de este efecto adverso (hipoglicina-A) disminuye hasta valores seguros una vez que el fruto se abre (Kouassi et al., 2020). La sintomatología incluye vómitos, debilidad, pérdida de conciencia e incluso la muerte. A pesar de

ello, el arilo que constituye la parte comestible del fruto ha sido importante en la dieta tradicional de países como Jamaica, siendo incluso el árbol nacional (Sander et al., 2020). En otros países caribeños como Costa Rica su consumo es más típico de la gastronomía de poblaciones afrodescendientes (Sánchez, 2022).

Por otro lado (Adekola et al., 2022) estudiaron las propiedades antiinflamatorias de los frutos con ensayos in vitro usando ensayos por desnaturalización de albúmina y estabilización de membranas de los glóbulos rojos a diferentes concentraciones. Los principales hallazgos encontraron que el efecto protector se debía a la fracción de metabolitos extraídos con acetato de etilo.

Tal como se ha mencionado previamente, la maduración del fruto afecta la composición de metabolitos en general y de *B. sapida* en particular debido a los alcaloides conocidos como hipoglicinas que se encuentran en cantidades peligrosas cuando el fruto esta verde. Al respecto Sybron et al (2019) analizaron el perfil de polifenoles durante el proceso de maduración mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia con detector de masa (UHPLC-MS) logrando identificar diecisiete fenoles distintos, siendo el nivel más alto el ácido vainillínico en las semillas del fruto verde (15 mg/ gMS); en cuanto a los exocarpios el fenol más abundante fue el kaempferol-3-O-rutenósido.

Además del estado de maduración los factores edáficos, altura, ambientales e incluso las técnicas de cultivo tienen el potencial de alterar la composición fitoquímica (Yang et al., 2018). Las variedades de *B. sapida* costarricense no han sido analizadas en cuanto a su valor nutracéutico. La revisión de la literatura solo permitió identificar un estudio de enfoque agronómico y comercial basado en la caracterización de sitios de cultivo, distribución y posibles canales de comercialización, así como su potencial económico (Quesada & Barrantes, 2019).

Algunos estudios han mostrado que el fruto del ackee ha sido subutilizado y por ello las investigaciones se han enfocado en encontrar todos los beneficios posibles que este árbol posea. Así, se han encontrado resultados que evidencian la capacidad absorbente que tienen las semillas para absorber y eliminar colorantes a partir de soluciones acuosas (Adebayo et al., 2020).

La composición de metabolitos secundarios en *B. sapida* al igual que en cualquier otro producto de origen natural es muy variada. Sin embargo, las investigaciones sobre las propiedades nutracéuticas se centran fundamentalmente en polifenoles y su actividad antioxidante. En especies africanas, por ejemplo, se determinó que los arilos del fruto en etapa comestible tenían un contenido

de polifenoles totales de 244.29 $\mu\text{gEAG/g MS}$ (miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca), 450.97 $\mu\text{gEAG/g MS}$ en las semillas y 652.72 $\mu\text{gEAG/g MS}$ en el exocarpio (Sybron et al., 2019).

Tal como se ha señalado, los hallazgos encontrados de manera preliminar en la literatura científica son primordialmente procedentes de países africanos. Debido a las condiciones geográficas tan radicalmente distintas a las costarricenses estos estudios nos son extrapolables. Por tal motivo, el potencial de las variedades costarricenses constituye un campo prometedor en cuanto a la búsqueda de moléculas bioactivas.

1.2. Justificación

La salud del ser humano se ha visto afectada por un estilo de vida acelerado y una dieta poco saludable, siendo esta última causante de múltiples enfermedades (Vila, 2020). Por ejemplo, la ingesta de carbohidratos complejos, el consumo de alimentos altamente calóricos, ricos en azúcares y grasas saturadas, ha dado lugar a un aumento de enfermedades de índole cardíaco junto con otras como la diabetes, la hipertensión y la obesidad, que afectan a la población en general (Aguirre et al., 2021).

La Asociación Americana del Cáncer ha desarrollado estudios que muestran que las principales causas de muerte en el mundo son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con problemas de nutrición. De esta manera, se estima que un 70% de los enfermos con cáncer presentan a su vez inconvenientes debido a la carencia de nutrientes (Gómez et al., 2022).

Ante la situación mencionada anteriormente, numerosos estudios epidemiológicos sugieren que las dietas ricas en fitoquímicos y antioxidantes provenientes de plantas desempeñan un papel protector en la salud. Por ende, un consumo frecuente de frutas y verduras se asocia con un menor riesgo de padecer cáncer, enfermedades cardíacas o problemas cerebrovasculares (Hernando & García, 2021). De este modo, se ha prestado mucha atención a la posible bioactividad y al efecto nutritivo de varias clases de fitoquímicos tales como carotenoides, fitoestrógenos, glucosinolatos y compuestos polifenólicos llamados flavonoides (Zamora & Barbosa, 2020).

Actualmente, en varias especies de plantas, se han podido identificar más de 8 000 compuestos polifenólicos a los cuales se les atribuye capacidad anticancerígena, antidiabética, anti

envejecimiento y neuroprotectora (Arias et al., 2018). Muchos de los compuestos fenólicos con mayores efectos antioxidantes se han encontrado en alimentos con colores intensos, amarillos, rojos y azules. Esto como consecuencia de algunas moléculas fenólicas como las antocianinas (Fernández & Lizana, 2020). Bajo esta perspectiva, se espera que en la especie *B. sapida* introducida en Costa Rica sea una fuente importante de polifenoles debido a sus coloraciones. Los tonos entre rojos y amarillos de las frutas influyen en el factor de la variedad de la planta, por lo cual es esperable encontrar diferencias en este factor debido a que el color de las frutas está asociado a la presencia de polifenoles y flavonoides (Acosta & Mazo, 2020).

De esta manera, el análisis de la composición de metabolitos secundarios en plantas como *B. sapida* contribuye a incorporar nuevas fuentes que aporten propiedades nutraceuticas a favor de la salud humana. Por su origen africano (Ajayi et al., 2019), esta planta debió sufrir una serie adaptaciones para sobrevivir y extenderse a países como Costa Rica. Los reportes de usos etnobotánicos son numerosos, por ejemplo, se han utilizado como gotas para los ojos en lesiones oftálmicas, conjuntivitis y fiebre amarilla. Estos reportes etnobotánicos, que constituyen conocimiento popular de los pueblos, son un reflejo del potencial antibiótico de la planta dado que se refieren a afecciones causadas por microorganismos (Vandebroek & Voeks, 2018).

Cabe mencionar que en Costa Rica el ackee no es un alimento de consumo extendido, sino que se usa solamente en cocina tradicional en la zona caribeña. Por este motivo es poco conocido, y su caracterización fitoquímica y propiedades en nuestro país aún no se conocen bien. El consumo de este fruto ha sido por consiguiente consecuencia del gusto más que de sus propiedades farmacológicas.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la búsqueda de metabolitos secundarios y sus concentraciones relativas será importante, lo mismo que la determinación de la actividad antioxidante para combatir afecciones derivadas del estrés oxidativo. Este estudio permitirá revalorizar el uso del ackee como alimento y como fuente de moléculas bioactivas con potencial antibiótico para posibles aplicaciones biotecnológicas y uso comercial como nutraceutico en el país, sin dejar por fuera una oportunidad de aplicar una economía circular que genere fuentes de trabajo y activación económica, fundamentalmente en la zona atlántica.

1.3. Planteamiento del problema

Tomando en cuenta que el ackee costarricense no ha sido caracterizado fitoquímicamente, ha surgido la siguiente interrogante. ¿Cuál es el potencial nutracéutico y antibiótico del ackee producido en la región caribeña de Costa Rica?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Comprobar el contenido de polifenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos crudos del ackee (*Blighia sapida*), empleando los métodos de Folin-Ciocalteu, pH diferencial, capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno y ensayos de difusión con microorganismos seleccionados para la valorización de su potencial nutracéutico.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Examinar el contenido de polifenoles y antocianinas totales presentes en los extractos crudos del ackee, empleando el método de Folin-Ciocalteu y el de pH diferencial respectivamente, para su posible caracterización como alimento funcional.
2. Determinar la relación entre la concentración de los polifenoles totales del ackee y su actividad antioxidante mediante el método de Capacidad de Absorbanza de Radicales de Oxígeno (ORAC) como parámetro relevante en la potencial disminución del estrés oxidativo.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano de extractos de *B. sapida* sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa* y *Enterococcus faecium* (ESKAPE) mediante el método de difusión en agar por pozos, como estrategia para la búsqueda de antibióticos de origen natural.

2. Marco Teórico

Alimentos funcionales y sus componentes

Los alimentos funcionales se definen como aquellos alimentos que contienen componentes que promueven la salud más allá de los nutrientes tradicionales (carbohidratos, proteínas, lípidos, micronutrientes). Este tipo de alimentos también son conocidos con otros nombres como alimentos de diseño, alimentos medicinales, nutraceuticos, alimentos terapéuticos y súper alimentos (Añazco et al., 2021). Cuando se identifican como alimentos nutraceuticos el enfoque es centralizado en compuestos que ejercen efectos farmacológicos los cuales modulan funciones terapéuticas en el cuerpo resultando en beneficios para la salud (Maqsood et al., 2020). Además, estos alimentos se caracterizan por poseer sustancias bioactivas favorables para la salud y tienden a ser ingeridos en forma concentrada como píldoras, pastillas, cápsulas o tónicos (Durazzo & Lucarini, 2019).

Los metabolitos secundarios presentes en los alimentos tienen efectos positivos en la prevención y el tratamiento contra enfermedades. Existen evidencias específicas de cómo los padecimientos de origen coronario son disminuidos a causa del consumo de biomoléculas como los carotenoides (Lisset et al., 2018). Los productos naturales se han vuelto una de las áreas de mayor investigación para la búsqueda de nuevos antioxidantes y antibióticos (Alim et al., 2019). Los antioxidantes pueden contribuir a mantener los niveles de radicales libres en concentraciones apropiadas (Mora Agüero et al., 2019). Por otro lado, la búsqueda de antibióticos menos invasivos es una necesidad imperiosa que se ha vuelto constante. Adicionalmente, los microorganismos al mutar generan resistencia. De tal manera que, tanto la capacidad antioxidante como la actividad antibiótica son parámetros que proveen información sobre el potencial nutraceutico de los alimentos (Reyes et al., 2019).

Recientes estudios sobre la soja negra han demostrado que la cobertura de su semilla puede disminuir la obesidad y la resistencia a la insulina. Este alimento tiene más fibras, lo cual le confiere un papel vital para reducir el azúcar en la sangre. Está probado que una taza de soja negra contribuye con alrededor de 15 g de fibra. Además, el extracto de la cubierta de semillas de este producto contiene alto material alimenticio rico en polifenoles conformados por un 9,2% de cianidina 3-glucósido(C3G), un 6,2% de catequinas, un 39,8% de proantocianidinas, entre otros.

Compuestos como los antes mencionados previenen la obesidad y la diabetes al aumentar el gasto de energía y suprimir la inflamación (Kumar & Baojun, 2017).

Investigaciones realizadas en Costa Rica con el árbol de Guayaba rosada (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla'), identificaron en su fruto el contenido de carotenoides importantes. Estos fueron del tipo trans- β -caroteno, 15-cis-licopeno y trans-licopeno, los cuales estuvieron presentes en todas las etapas de maduración de la fruta. Sumado esto, se descubrió con ayuda de ensayos espectrofotométricos que el trans-licopeno era el carotenoide predominante (63% a 92% del total) y responsable de la alta capacidad antioxidante de este alimento (Rojas et al., 2017).

Origen y concepto de alimento funcional

El concepto de alimento funcional fue incorporado por primera vez en Japón y luego se extendió a nivel mundial con ciertas diferencias relacionadas a la cultura, situaciones de mercado o la diferente manera de comprender y aplicar la nutrición. Por ejemplo, en Norteamérica, para definir un alimento como funcional, éste debe de haber pasado por alguna modificación estructural o de forma, a diferencia del país japonés en donde unas cápsulas o píldoras pueden considerarse alimentos funcionales. No obstante, independientemente de estas definiciones las poblaciones empezaron a darse cuenta de la importancia de mantener y mejorar la salud debido al aumento de enfermedades relacionadas con el estilo de vida (John, 2021).

El proyecto europeo de Ciencias de Alimentos Funcionales y el Instituto de Ciencias de la Vida (FUFOSE e ILSI por sus siglas en inglés respectivamente) definieron que un alimento funcional es aquel que logra llevar a cabo un efecto beneficioso específico a nivel fisiológico en el organismo, mejorando la salud y a la vez minimizando la posibilidad de sufrir enfermedades (Adadi et al., 2019).

La industria de alimentos ha ido creciendo paulatinamente y con ello la incorporación de nuevos productos relacionados a alimentos funcionales (Iwatani & Yamamoto, 2019). Tal es el caso de los nutraceuticos, los cuales poseen metabolitos secundarios que generan una combinación nutricional junto con propiedades farmacológicas positivas para la salud humana. Estos alimentos tienen la distinción de ejercer un rol mucho mayor al de un suplemento dietético pues con ellos se tratan una serie de enfermedades como osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, la obesidad,

el cáncer, la artritis, la diabetes y el colesterol, entre otras enfermedades crónicas degenerativas para ayudar a mantener de manera normal las funciones fisiológicas (Srivastava et al., 2018).

Alimentos funcionales con propiedades antioxidantes

La incorporación de metabolitos secundarios a través de alimentos funcionales ha ido en aumento gracias a las propiedades y efectos beneficiosos que estos aportan al organismo humano. La investigación científica arroja resultados y ejemplos de interés para analizar las propiedades antioxidantes de este tipo de alimentos (Parcheta et al., 2021).

El ingreso de compuestos fenólicos al organismo desencadena actividades biológicas en contra de fenómenos como el estrés oxidativo causante de daño celular. Alimentos como el Rambután (*Nephelium lappaceum* L.) o mamón chino han sido estudiados, no sólo por la ingesta de su pulpa la cual tiene reportes satisfactorios en cuanto a la cantidad de polifenoles totales que aporta 9.034 mg EAG/100 g (miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca), sino también por los antioxidantes localizados en su exocarpio, el cual ha sido tratado como un simple desecho (Kim et al., 2018).

De igual manera, la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides en alimentos funcionales como la miel, el propóleo y la jalea real transfieren propiedades biológicas que favorecen la salud. Estas propiedades van desde acciones antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas y vasodilatadoras (Fraire et al., 2022). Además, los flavonoides actúan inhibiendo la permeabilidad y fragilidad capilar, la agregación plaquetaria, la peroxidación lipídica y la actividad de los sistemas enzimáticos que incluyen ciclooxigenasa y lipoxigenasa generando un equilibrio fisiológico importante para el bienestar del ser humano (Gutiérrez, 2018).

Otro ejemplo de mucho valor que forma parte de los alimentos funcionales es la Granada (*Punica granatum*). El fruto de la granada ha sido sometido a pruebas clínicas dando resultados provechosos en la prevención y combate de enfermedades cardiovasculares, cáncer de próstata y enfermedades crónicas que cobran miles de vidas al rededor del mundo. Los efectos antioxidantes que posee este alimento, sus jugos y extractos son fundamentados por el contenido de polifenoles como la punicalagina, el ácido gálico, y el ácido elágico. Estos polifenoles son metabolizados en el sistema digestivo para dar paso a la formación de otras biomoléculas llamadas urolitinas que están relacionadas con la inhibición de células cancerígenas (Schetter et al., 2021).

Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias con la capacidad de prevenir la oxidación de otras moléculas dentro del organismo inclusive estando en bajas concentraciones. El producto de las reacciones de oxidación son los radicales libres que desencadenan reacciones que dañan las células, por lo cual, el papel fundamental de los antioxidantes es inhibir estas reacciones y al mismo tiempo eliminar intermediarios del radical libre, oxidándose ellos mismos. De ahí que, los antioxidantes son reconocidos como agentes reductores, siendo los polifenoles los más estudiados en la literatura científica (Zenia et al., 2022).

Sumado a lo anterior, los antioxidantes sintéticos (BHA, BHT y galato de propilo) como los productos botánicos naturales contienen compuestos fenólicos que funcionan en contra del estrés oxidativo (Serra Bisbal et al., 2020). Los compuestos fenólicos actúan sobre las cadenas de radicales libres donando átomos de hidrógeno para producir una neutralización. El propósito más importante de los antioxidantes es evitar la oxidación de lípidos, proteínas, ARN y ADN (Valladares et al., 2018).

Modo de acción de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden trabajar en tres maneras diferentes ante los radicales libres (RL): 1) Prevención: manteniendo la formación de especies reactivas a un nivel mínimo, con ayuda de agentes quelantes como la deferoxamina. 2) Intercepción: eliminando especies reactivas mediante el uso catalítico o no catalítico de moléculas como, por ejemplo, el ácido ascórbico, α -tocoferol, etc. 3) Reparación: reparar moléculas dañadas, con ayuda de especies como el glutatión considerado uno de los antioxidantes endógenos más poderosos (Engwa, 2018).

Los sistemas antioxidantes se clasifican en dos grupos principales, antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Los de tipo enzimático que se encuentran presentes en el cuerpo incluyen al superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa que actúan como la primera línea de defensa del cuerpo contra los RL catalizando su conversión de tal forma que haya especies menos reactivas o inertes. Además, existen dentro de la célula, moléculas de bajo peso molecular que proporcionan una defensa secundaria contra radicales libres. Algunos ejemplos de tales moléculas incluyen glutatión, α -tocoferol, ascorbato y bilirrubina. Estas moléculas pueden

movilizarse para ir a neutralizar a los RL o prevenir la producción mediante el secuestro (quelación) de metales activos con capacidad redox como lo son el hierro y el cobre (Zárate et al., 2021).

Antibióticos naturales

La capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos es lo que se conoce con el nombre de actividad antibiótica (Mesén-Mora et al., 2019). Existen compuestos que presentan esta capacidad y por ende el interés por estudiar su efecto sobre microorganismos es cada vez mayor e importante. La finalidad de las investigaciones en este campo radica en poder obtener resultados como el control y la eliminación de especies patógenas las cuales provocan infecciones que ponen en riesgo la salud y vida del ser humano (Furusawa et al., 2018).

La investigación de la actividad antibiótica o antibacteriana en plantas y vegetales, así como la propiedad antiviral se ha vuelto fundamental en los últimos años. Entre los polifenoles que han dado resultados interesantes se pueden citar a los flavan-3-oles, flavonoles y taninos debido a su amplio espectro y mayor actividad antimicrobiana en comparación con otros polifenoles. Además, en relación con esos tres grupos de moléculas bioactivas, los resultados han mostrado que la mayoría de ellas son capaces de suprimir una serie de factores de virulencia microbiana como la inhibición de la formación de biopelículas, la reducción de la adhesión de los ligandos del huésped y la neutralización de toxinas bacterianas, sin dejar fuera la sinergia que logran tener con otros antibióticos (Zevallos, 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que los extractos de té verde inhiben el crecimiento de *Streptococcus mutans in vitro* y previenen su unión al esmalte dental. Estas actividades probablemente se asociaron con las catequinas las cuales son otro tipo de polifenoles presentes en plantas. De la misma manera, extractos de té de Oolong redujeron la formación de placa dental en humanos, siendo parte de los hallazgos importantes para el sector de la salud (Tsuru et al., 2021).

Modo de acción de los antibióticos

La actividad antibiótica de los polifenoles está relacionada con la posición o cantidad de grupos hidroxilo en el anillo aromático (Martín, 2018). Esta característica incidirá en la toxicidad

que tendrá el antioxidante ante el microorganismo debido que al haber una mayor hidroxilación así también será la toxicidad. El modo de acción del efecto antibiótico se da a raíz de un proceso que activan los polifenoles produciendo una inhibición de la síntesis de la pared celular, así como de las funciones de la membrana celular, la traducción de material genético y la síntesis de ácidos nucleicos, provocando la muerte del microorganismo (Latorre et al., 2019).

En distintos estudios de antibiogramas se han extraído polifenoles como los taninos hidrolizables (galotaninos) de muestras obtenidas del árbol de mango (*Mangifera indica* L.) para determinar su efecto antibacterial sobre microorganismos como *B. subtilis* y *E. coli* (Reyes et al., 2017). El modo de acción detectado fue la inhibición enzimática de telomerasas, ciclooxigenasas o lipoxigenasas sumado a las propiedades quelantes de metales como el hierro, el cual al ser secuestrado o inmovilizado da como resultado la reducción el crecimiento del microorganismo (Olivas et al., 2021).

Método Kirby-Bauer para evaluación de la actividad antibiótica

Este método es conocido comúnmente como método de difusión en el gel. Se basa fundamentalmente en incorporar al medio de cultivo el antibiótico o el microorganismo para que luego de solidificado al medio se adicione la contraparte y observar inhibición de crecimiento o halos de inhibición según la técnica utilizada. Esta técnica también abarca la de discos de papel, en los cuales hay un control positivo (el antibiótico) que se encuentra incorporado a estos. El antibiótico está en una concentración conocida. Los discos se colocan sobre la superficie de agar contenido en una placa Petri donde ya está sembrado el microorganismo en estudio. Luego se procede a incubar a la temperatura y tiempo adecuados para finalmente observar y medir los halos de inhibición de crecimiento (Sabee et al., 2020). La ventaja de este método respecto a los demás, es que utiliza una pequeña cantidad de la muestra y ofrece la posibilidad de ensayar varias sustancias contra un mismo microorganismo.

Bacterias ESKAPE y su resistencia a la actividad antibiótica

La investigación a nivel de la medicina actual, en áreas como la biotecnología, microbiología, bioquímica y farmacia, invierten valiosos recursos para afrontar y reducir las consecuencias producidas por microorganismos patógenos en la salud humana. Las enfermedades

infecciosas han sido investigadas durante muchos años, especialmente por el fenómeno de la resistencia antibacteriana que ha producido una demanda en el uso de antibióticos para resguardar la vida humana, animal y vegetal (Jiménez et al., 2019).

La producción de antibióticos, moléculas capaces de eliminar y suprimir a los microorganismos patógenos se vuelve un objeto de estudio diario en laboratorios a nivel mundial. Todo esto, con el propósito de mejorar las capacidades bacteriostáticas y bactericidas de dichos compuestos (Gomes et al., 2020).

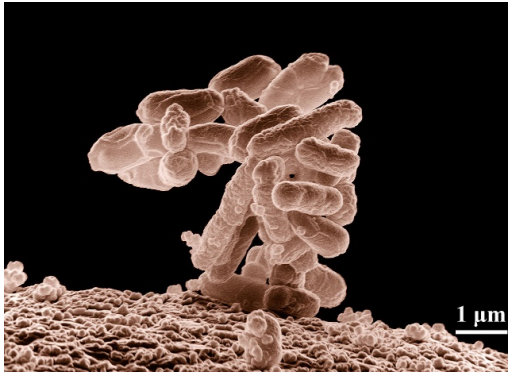
La lucha contra la resistencia antimicrobiana ha desencadenado un esfuerzo por parte de la comunidad científica, la cual ha recurrido al estudio de un grupo específico de patógenos, que a nivel mundial se encuentran dentro de los principales causantes de pérdidas de vidas humanas en cuanto a infecciones hospitalarias. A este grupo de microorganismos en particular se le conoce con el nombre de bacterias con el acrónimo ESKAPE (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. faecium*.) (De Angelis et al., 2018).

Estados Unidos ha sido uno de los mayores inversores económicos en cuanto al control y prevención de enfermedades provocadas por patógenos resistentes a varios tipos de antibióticos. Lo anterior es una problemática que precisa de soluciones, análisis y estrategias de la mano de la investigación exhaustiva ante uno de los mayores retos del siglo XXI (Chávez-Jacobo, 2020).

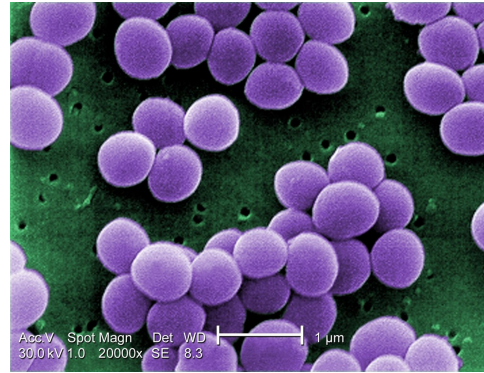
Las bacterias ESKAPE han mostrado una vasta gama de infecciones que ameritan múltiples estudios por la singular capacidad de escapar o resistir a diferentes antimicrobianos. Por tanto, estas seis bacterias tienen sus características y detalles a considerar. En cuanto a su morfología estas bacterias son distintas entre sí, siendo algunos cocos y otros bacilos, incluso con flagelos (figura 1).

Figura 1

Micrografías y representaciones de las bacterias ESKAPE.



Escherichia coli



Staphylococcus aureus



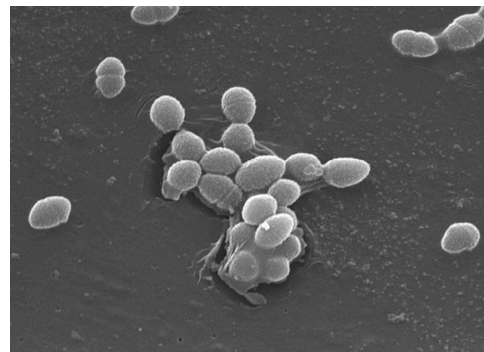
Klebsiella pneumoniae



Acinetobacter baumannii



Pseudomonas aeruginosa



Enterococcus faecium

Nota. Créditos: Christopher Pooley (FDA, USA). Janice Haney Carr Centers for Disease Control and prevention's Public Health.

E. coli es un microorganismo aeróbico principalmente encontrado en la flora intestinal de animales y seres humanos. Sin embargo, puede convertirse en patógeno en lugares como el tracto urinario y la sangre. Es una bacteria gram-negativa no formadora de esporas, que se moviliza por flagelos peritricos. Esta bacteria es la causante de las infecciones del tracto urinario (Denamur et al., 2021). Dentro de otras afectaciones que produce estos microorganismos, está la enteritis aguda, la sepsis, abscesos y la meningitis neonatal, sin olvidar la enfermedad conocida como la diarrea del viajero (Ríos-Muñiz et al., 2019). *E. coli* ha sido ampliamente estudiada presentando cepas que pueden causar enfermedades de mucha importancia. Es un microorganismo que adquiere una rápida resistencia ante la presencia de fármacos antimicrobianos (Bonten et al., 2021).

S. aureus por su parte es una bacteria presente en la piel y la cavidad nasal, es un coco gram positivo, catalasa positivo y coagulasa positivo. Algunas cepas de *S. aureus* presentan resistencia a distintos antibióticos como la meticilina (Álvarez et al., 2019). El ingreso de este microorganismo al torrente sanguíneo suele darse por afecciones en la piel o la mucosa provocando infecciones de mucha importancia a nivel de la medicina hospitalaria. Patologías como la neumonía, la artritis y la osteomielitis son producto de la presencia de este patógeno (Aravena et al., 2021).

K. pneumoniae, es una bacteria que está asociada a la enfermedad de la neumonía y fue analizada por primera vez en el año 1882, al ser aislada en los pulmones de los pacientes fallecidos por dicha enfermedad. Como bacteria se describe como gram negativa, facultativa que se desarrolla en rangos de temperatura que van desde los 30 a 37 °C, provocando una variedad de patologías muy comunes en los hospitales (Wyres et al., 2020). La infección del tracto urinario se convierte en una de las más recurrentes y comunes por parte de esta bacteria y al estar presente en recursos como el agua, la tierra y la superficie de la mucosa animal, se torna en un alto factor de riesgo en los hospitales, esto debido a que varios estudios evidencian que muchas de sus cepas se mantienen a lo interno de las mismas instalaciones (Wang et al., 2020).

A. baumannii, es una bacteria multirresistente, gram negativa, cocobacilo, inmóvil, no formador de esporas, cuyo crecimiento se genera en temperaturas entre los 20 a 30 °C que le permiten estar en ambientes hospitalarios y con mucha facilidad en la naturaleza convirtiéndola en un microorganismo oportunista que infecta a pacientes con sistema inmunológico comprometido o debilitado (Whiteway et al., 2022). Durante los años setenta, se consideró a *A. baumannii* vulnerable ante la mayoría de antibacterianos. No obstante, en la actualidad ha llegado a mostrar una gran

resistencia contra varios antibióticos como las cefalosporinas, penicilinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Kyriakidis et al., 2021).

P. aeruginosa, es un bacilo gram negativo, oportunista en seres humanos y también en plantas, aerobio, pero con la particularidad de poder crecer en condiciones anaerobias lo cual le permite colonizar distintos tipos de ambientes con versatilidad, incluyendo su presencia en estructuras como ventiladores y espacios hospitalarios (Pang et al., 2019). Debido a la alta patogenicidad y resistencia que presenta *P. aeruginosa*, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha priorizado la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos. Esto, por la capacidad que tiene el patógeno de desarrollar biopelículas que le permite escapar ante la presencia de antibióticos y así dañar el sistema inmune de los pacientes (Thi et al., 2020).

El grupo ESKAPE es completado con *E. faecium*, un microorganismo gram positivo, anaerobio facultativo, resistente a antibióticos como la vancomicina y las fluoroquinolonas (Mancuso et al., 2021). Los enterococos son parte de la microflora normal del tracto gastrointestinal de humanos y animales, siendo causantes de enfermedades como lo son, prostatitis, endocarditis, bacteriemias, entre otras. Las personas afectadas por *E. faecium* suelen ser pacientes con un sistema inmunológico comprometido, que se encuentran en unidades de cuidado intensivo lo cual los vuelve susceptibles a infecciones (Feßler et al., 2022).

Métodos de análisis de metabolitos secundarios con valor nutracéutico

Cuantificación de polifenoles totales empleando el ensayo de Folin-Ciocalteu

El método Folin-Ciocalteu consiste en que los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu el cual está formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce por la acción de los polifenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}) (Blainski et al., 2013). La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorbancia a 755 nm y se cuantifica por espectrofotometría empleando una curva de calibración. La naturaleza química del reactivo de Folin-Ciocalteu no está totalmente conocida, sin embargo, se cree que la reacción entre los reactivos anteriormente mencionados forma un complejo molibdotungstosfosfórico ($3H_2O-P_2O_5-13WO_3-5W_8O_{23}-10H_2O$) de color amarillo y la

reacción con los grupos fenólicos forma un complejo azul (fenol-MoW₁₁O₄₀). Este cambio de coloración de amarillo a azul se da por la transferencia de un electrón entre el ion fenolato del polifenol y el molibdeno del complejo molibdotungstosfosfórico. Esta reacción se lleva a cabo sólo en condiciones básicas (pH ~ 10), y para esto se emplea una disolución de carbonato de sodio (Martins et al., 2021).

Métodos para cuantificar antocianinas

Muchas frutas son ricas en antocianinas y en la mayoría de los estudios publicados se ha realizado la identificación y cuantificación de estos pigmentos. Para ello se utilizan técnicas de química analítica como cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS y cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) usando el método de estándar externo con base en la respuesta de compuestos patrón (Paun et al., 2022). También se ha utilizado el método de pH diferencial, para la obtención de la concentración de las antocianinas totales. Este método se basa en las transformaciones reversibles que sufren las antocianinas con los cambios de pH, manifestado por un cambio en la absorbancia. La forma oxonio predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es un método basado en esta reacción, y permite una rápida y eficiente medida de las antocianinas totales (Anzolin et al., 2022).

Métodos para cuantificar la actividad antioxidante

Uno de los métodos más utilizados en el campo de ciencias de los alimentos para determinar la actividad antioxidante es conocido como Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés). Este método básicamente se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante hacia el radical libre. Como generador de radicales libres se utiliza el ácido 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorídrico (AAPH), el cual en un medio acuoso genera radicales peroxil del tipo ROO• (Rojano et al., 2012). En el proceso un mol de AAPH, pierde un mol de nitrógeno, para generar de esta manera dos moles del radical AAPH a una tasa constante (Zapata, 2014). La pérdida de fluorescencia de la fluoresceína de sodio es el indicador del grado de oxidación con el radical peroxil. Si esta reacción ocurre en presencia de sustancias

antioxidantes, del tipo ROO• captará un átomo de hidrógeno del antioxidante estable, del tipo ArO• generando un retardo en la degradación de la fluoresceína lo cual es posible cuantificar (López & Denicola, 2013).

Polifenoles

Estructuralmente los compuestos fenólicos parten de una molécula básica llamada fenol. Este compuesto se compone de un anillo aromático conocido por el nombre de fenilo que a su vez se encuentra unido a un grupo hidroxilo (OH). El anillo aromático desempeña un papel importante en las propiedades antioxidantes puesto que los pares de electrones conjugados permiten que haya deslocalización de electrones que tiene el potencial de estabilizar especies radicalarias haciéndolas menos reactivas. Adicionalmente, dichos anillo también confieren propiedades como la actividad antibiótica, antiparasitaria y citotóxica (Rodríguez et al., 2020). Cuando los compuestos fenólicos naturales tienen varios grupos hidroxilados se les llama polifenoles, siendo uno de los grupos de metabolitos más importantes. Los polifenoles forman parte de los metabolitos secundarios más abundantes y distribuidos en el reino vegetal, siendo especialmente notable su diversidad. Se conocen y se han contabilizado más de 8000 estructuras fenólicas de las cuales se han identificado entre ellas más de 4000 flavonoides (De la Rosa et al., 2019).

Las funciones biológicas de este tipo de componentes suelen ser muy variada, y cada año se suman nuevos hallazgos en cuanto a sus usos potenciales. Así, por ejemplo, se ha logrado identificar que protegen a las plantas de los insectos, la radiación ultravioleta, el estrés y las infecciones microbianas además de atraer a los polinizadores. Los compuestos fenólicos también ejercen una serie de funciones metabólicas relacionadas con el crecimiento y reproducción. En adición, estas biomoléculas son responsables del color y características sensoriales en las plantas y sus componentes (frutos, semillas, flores, etc.). Por ejemplo, la astringencia que presentan frutas y hortalizas tiene relación con la presencia de estos metabolitos secundarios (Mrduljaš et al., 2017).

Para efectos de aprovechamiento para usos humanos, existe información muy robusta sobre los beneficios de su incorporación en la dieta, una de las más importantes y estudiadas es la capacidad de ser agentes reductores como también lo son la vitamina C, vitamina E y los carotenoides. Estos agentes naturales son utilizados por el organismo para proteger al cuerpo contra el estrés oxidativo, enfermedades cardíacas, derrames cerebrales e inclusive enfermedades neurodegenerativas como la demencia (Ordoñez et al., 2018).

Estructura y clasificación de los compuestos fenólicos

Factores como el número de anillos de fenol y los elementos estructurales en la molécula que se unen entre sí generan varias categorías de clasificación (Cutrim & Cortez, 2018). En este sentido no existe una clasificación única, sino que hay varias, algunas por ejemplo priorizan las propiedades químicas como solubilidad, mientras que la mayoría agrupa los compuestos de acuerdo con características estructurales como el número de anillos aromáticos e hidroxilos. Los compuestos fenólicos más simples tienen un solo anillo aromático que puede ser sencillos como el resorcinol (C6) o pueden contener un número de carbonos adicional C6-Cn donde n es un número que va de 1 a 4. Por ejemplo (C6-C1) como los ácidos fenólicos entre los que se puede encontrar al ácido gálico, también están los C6-C2 como las acetofenonas, C6-C3 como los ácidos hidroxinámicos y C6-C4 como las naftoquinonas (Tabla 1).

Tabla 1

Clasificación de compuestos fenólicos con un anillo aromático.

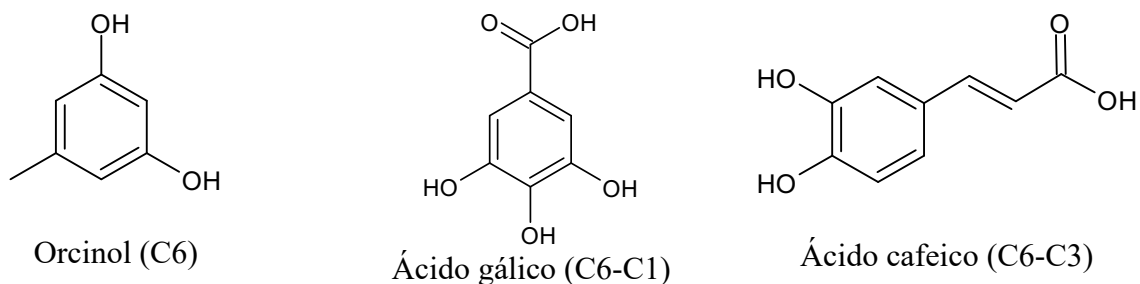
Esqueleto	Grupo	Ejemplos
C6	Fenoles simples Benzoquinonas	Timol, resorcinol, orcinol
C6-C1	Ácidos fenólicos Aldehídos fenólicos	Ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico Vainillina
C6-C2	Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos	2-hidroxiacetofenona
C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos cumarinas Cromonas y phenilpropenos	Ácido cafeico, ácido ferúlico Escopoletina, umbeliferona
C6-C4	naftoquinonas	

Nota. Información tomada y adaptada de Biosynthesis Regulation of Folates and Phenols in Plants (p. 7), por A. Kolton, 2022, Elsevier B.V.

Los compuestos fenólicos mono aromáticos son muy abundantes, se estima que constituyen cerca de un tercio de los compuestos polifenólicos en la dieta. Son abundantes en bayas, kiwi, cereza, manzana, pera, achicoria y café son los alimentos con alto contenido de estos ácidos fenólicos (Rashmi & Negi, 2020). En la figura 2 se muestran las estructuras de algunos de estos fenoles.

Figura 2

Estructuras de algunos compuestos fenólicos mono aromáticos (C6 y C6-Cn).



Debido a la amplia diversidad de estructuras posibles los compuestos fenólicos van desde moléculas relativamente sencillas como las mostradas en la figura 2 hasta contener varios anillos aromáticos e incluso alcanzar estados poliméricos de pesos moleculares tan elevados como 20 000 Da. En cuanto a los di aromáticos tienen en común la estructura C6-Cn-C6, donde n es un número de uno a tres, aquí se ubican por ejemplo los flavonoides (C6-C3-C6) siendo el subgrupo más variado (Tabla 2).

Tabla 2

Clasificación de compuestos fenólicos con varios anillos aromático.

Anillos	Esqueleto	Grupo*	Ejemplos
2	C6-C1-C6	Xantonas	α -mangostin
	C6-C2-C6	estilbenos	Resveratrol
		antraquinonas	Emodina, catenarina
	C6-C3-C6	Flavonoides	Cianidina, quercitina, catequina
		Isoflavonoides	Genisteína, gliciteína
		Neoflavonoides	
(C6-C3) ₂	Lignanós	(+)-pinoresinol, (+)-sesamina	
	Neolignanós		
3 o más	(C6) _n	Catecol melaninas	
	(C6-C3) _n	Ligninas	
	(C6-C3-C6) ₂	biflavonoides	octoflavona
	(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados	

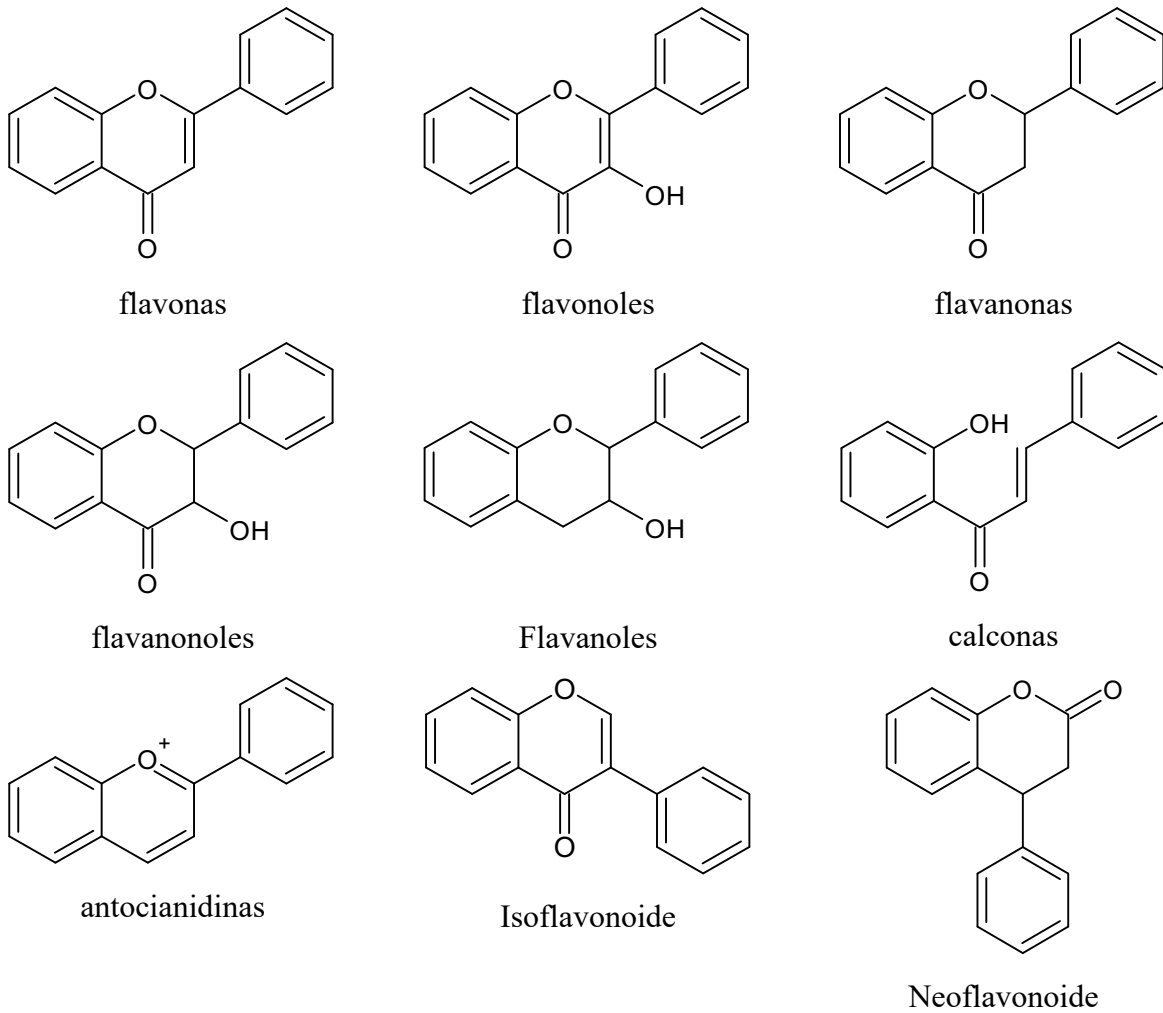
Nota. *A muchos de estos grupos se les atribuye propiedades organolépticas como color, astringencia, aroma o sabor amargo en los alimentos. Fuente:

Tal como se indicó los compuestos con dos anillos aromáticos (C6-C3-C6) dentro de los cuales se incluyen a los flavonoides son los más abundantes en la dieta humana. A la fecha se han identificado cerca de 4000 tipos de estos compuestos. Los cuales están subdivididos por ocho subclases (flavanonas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavan-3-oles, flavan-4-oles, flavan-3,4-oles (leucoantocianidinas) y antocianidinas (Koltón et al., 2022). Se encuentran contenidas en la familia de las bayas, el vino tinto, la col lombarda, la cereza, la uva negra y la fresa (Castro, 2019). Los flavonoles como la quercetina, kampferol y miricetina se pueden encontrar en alimentos como la cebolla, col rizada, puerros, brócoli y arándanos (Barreca et al., 2021). Las isoflavonas como la daidzeína, genisteína y gliciteína pueden ser encontrados en la soja y sus subproductos (Křížová et al., 2019).

Los lignanos por su parte son componentes difenólicos con actividad fitoestrogénica. Se encuentran en altas concentraciones en linaza, otros granos y cereales (Cui et al., 2020). En cuanto a los estilbenos se han hallado en gran proporción en uvas y vino tinto. El estilbeno más conocido es el resveratrol por sus propiedades en nutracéuticas y por su uso en formulaciones dermatológicas en el cuidado de la piel (El Khawand et al., 2018). En la figura 3 se muestra los patrones estructurales básicos en el esqueleto de cada uno de los principales grupos de flavonoides para su reconocimiento (Karak, 2019).

Figura 3

Estructura química de los diferentes tipos de flavonoides.

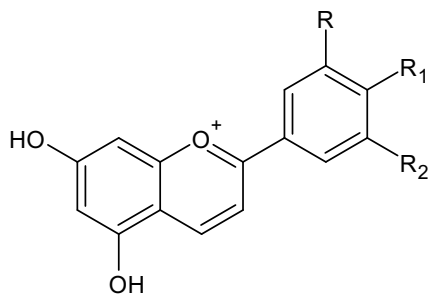


Por otro lado, en el grupo de los taninos algunos autores sugieren dos subcategorías de acuerdo con su comportamiento fisicoquímico, de tal manera que indican dos tipos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Otros compuestos como las labiataetaninas, cafetaninas y florotaninas también fueron incorporados a la familia de los taninos. Algunos de estos compuestos han sido estudiados en cuanto a sus actividades antitumorales, así como antioxidantes presentes en extractos de plantas como el té verde (Das et al., 2020).

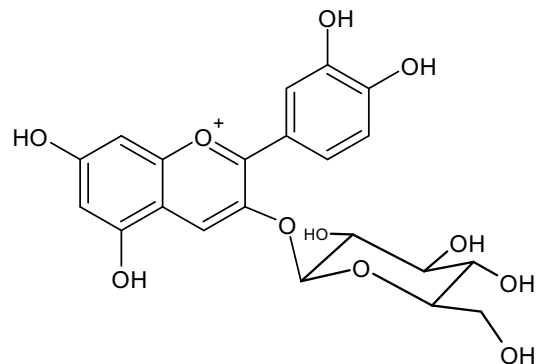
Por otro lado, es muy común de los compuestos fenólicos se encuentren enlazados a otros metabolitos que ayudan a aumentar su solubilidad y biodisponibilidad. Así, por ejemplo, es común encontrar flavonoides glucosidados. La cianidina 3-glucósido (C3G) también conocida como crisantemina es una de las antocianidinas más abundantes. Estas antocianidinas generan patrones de coloración muy característicos de los frutos y hojas. Cuando se encuentran glucosidadas se les llama antocianinas, es decir el término antocianidina se usa cuando hidroliza y pierde el carbohidrato formando al aglicona. Por otro lado, cuando las antocianinas se polimerizan se alcanzan compuesto de alto peso molecular que reciben el nombre proantocinidinas (PAC). Las diferentes formas en que se presentan estas antocianinas pueden ser ejemplificado con el caso de la C3G mostrada en la figura 4 (Shoib et al., 2020).

Figura 4

Estructura química de los diferentes tipos de flavonoides.

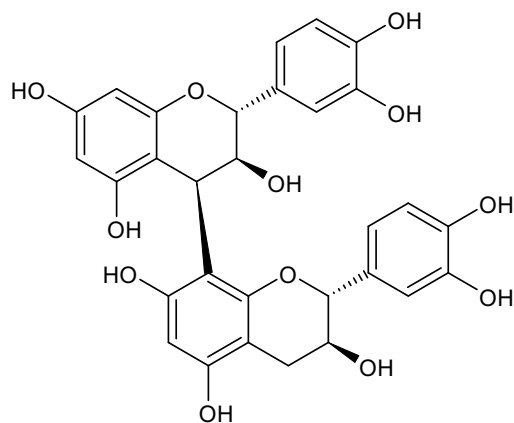


Antocianidina (una aglicona)



Cianidina 3-glucósido (C3G, una antocianina)

Continua figura...



Proantocianidina B1

Nota. Adaptada de Dietary Flavonoids in p53—Mediated Immune Dysfunctions Linking to Cancer Prevention (p. 10), por Shoib et al., 2020, MDPI.

Ackee

B. sapida, es una planta arbórea, principalmente conocida como ackee, ceso vegetal o manzana ackee. Geográficamente es una especie autóctona de las cordilleras del oeste tropical de África y su popularidad está dirigida al valor alimenticio que posee la parte comestible de su fruta llamada arilo. También ha sido estudiada por sus propiedades venenosas y aunque actualmente su consumo ha menguado en el continente africano, es considerado un manjar en otras partes del mundo. Por ejemplo, en Jamaica además de ser el árbol nacional, se ha convertido en un alimento de alto consumo debido a su contenido de grasas y proteínas (Moya et al., 2018).

Descripción botánica

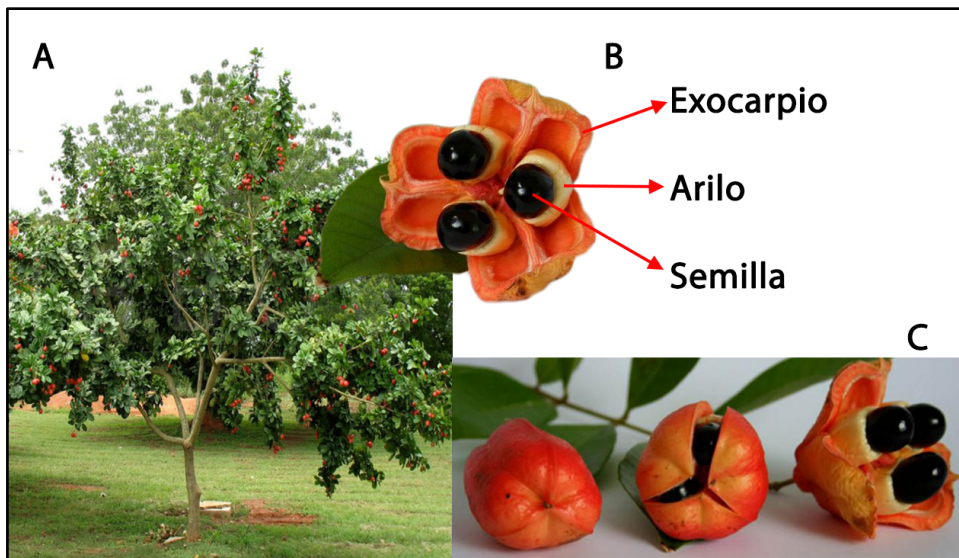
El árbol de ackee posee un tamaño de mediano a grande (9-23 m) con una forma redondeada que constituye un dosel en forma oval. Sus hojas son pinnadas (compuestas) alternas con 6 a 8 folíolos de color verde brillante con pecíolos cortos. Los pecíolos son rígidos y tiene un tamaño de 15 a 20 centímetros de largo. Las flores de ackee parecen tener los brotes de manera pseudoterminal, es decir la floración parece ser terminal pero el crecimiento continúa desde el área próxima al racimo lateral. Las flores son bisexuales y masculinas y se juntan en simples racimos de 7.5-17.5 centímetros de largo. Las flores blancas tienen 5 sépalos, 5 pétalos y un disco nectario en

la base, de los cuales 1 a 8 estambres están unidos, y un ovario superior se presenta con 3 estigmas (Quesada & Barrantes, 2019). Las principales temporadas de cosecha del ackee son de enero a marzo y de junio a agosto. La mayoría de los árboles de ackee pueden iniciar su floración y producción de frutas en 2 a 3 años, si se protegen adecuadamente (Mitchell et al., 2008).

En cuanto a la fruta, es una cápsula de 3 lóbulos, en forma de pera que tiene un cuero amarillo a rojo brillante tal como se aprecia en la figura 5. La fruta es de aproximadamente 7-10 cm de largo. En general, la fruta se vuelve roja al madurar. En la madurez, la cápsula se abre longitudinalmente para exponer 3 semillas duras, grandes y brillantes de color negro, que están colocadas parcialmente e incrustadas en el arilo (parte comestible) de color crema, carnosa y brillante. La base de cada arilo está unida al interior del extremo del tallo del fruto por una membrana que tiene un color rosado a naranja-rojo (Emanuel et al., 2013).

Figura 5

Morfología del árbol de B. sapida y su fruto.



Nota. A) estructura del árbol, B) partes que componen el fruto, C) estados de maduración de izquierda a derecha, fruto cerrado, fruto semi abierto, y fruto completamente abierto. Fuente: Elaboración propia.

Importancia comercial y usos etnobotánicos

El arilo de *B. sapida*, después de pasar por un proceso industrial es enlatado y comercializado en el Reino Unido y Canadá donde es consumido por inmigrantes jamaicanos. Sólo este componente del ackee genera 13 millones de dólares por año para Jamaica (Howélé et al., 2010). Los destinos de exportación del ackee alcanzan actualmente un total de 20 países (Mitchell et al., 2008).

En cuanto a usos etnobotánicos o medicina popular, se ha registrado que los extractos de *B. sapida* se emplean para el tratamiento de una serie de enfermedades. La pulpa que se obtiene de la corteza del árbol funciona como bálsamo contra edemas y dolores intercostales. Los extractos provenientes de sus hojas y su pulpa sirven como gotero en oftalmología y casos de conjuntivitis (Onuekwusi et al., 2014).

Estudios han comprobado la capacidad de *B. sapida* como insecticida natural ante el coleóptero *Dinoderus porcellus* Lesne (escarabajo de bambú) el cual se ha convertido en una peste en la región sub-Sahara del oeste africano al atacar sembradíos de ñame reduciendo las cosechas a polvo. Los extractos botánicos de las hojas del ackee probaron tener efectos antialimentarios, repelentes e insecticidas ante este insecto (Onuekwusi et al., 2014).

Otros usos relacionados con la capacidad medicinal de *B. sapida* muestran aplicaciones en donde los arilos maduros se mezclan con azúcar y canela para ser administrados como un febrífugo y tratamiento contra la disentería. Sumado a esto, las cataplasmas de la vaina del ackee han sido utilizados contra infecciones de la piel y manchas hepáticas. Así también, extractos acuosos de la semilla funcionan como desparasitantes. Finalmente, las hojas son utilizadas de distintas maneras, por ejemplo, las hojas trituradas son aplicadas sobre la frente ante un dolor de cabeza severo y el té o infusión de estas ayuda a aliviar el resfriado (Mitchell et al., 2008).

Composición fitoquímica

Las investigaciones acerca de *B. sapida* en relación con su composición fitoquímica se han enfocado generalmente en la parte comestible de la fruta (arilo) y en sus semillas, de las cuales hay escasos de datos en cuanto a estudios científicos (Aloko et al., 2017).

En una investigación, se sometieron semillas de *B. sapida* provenientes de Benín a diferentes métodos químicos para generar una caracterización del aceite contenido en este componente. Dentro de los resultados se destacaron la alta presencia de ácido eicosenoico con un 48.4% m/m, esteroides como el estigmasterol con un 54.6% m/m superando a otros esteroides presentes como el β -sitosterol (Akinpelu et al., 2017). En cuanto a antioxidantes se halló una concentración de 338 ppm distribuidos principalmente entre el α y β -tocoferol de gran importancia para la salud. Se suman a la composición, almidones, proteínas y fibras con porcentajes de 44.2, 22.4 y 15.6 % m/m respectivamente. A esto se añade la identificación de 17 aminoácidos lo cual ha despertado interés en cuanto a usos y aplicaciones del aceite de la semilla del ackee (Djenontin et al., 2009).

Por otra parte, el fruto de *B. sapida* presenta un contenido de azúcares importantes, tanto en su estado verde (inmaduro) como en su estado maduro. Estudios demuestran que el ackee posee fructooligosacáridos de cadena corta como es el caso del 1-kestosa (1F- β -D-fructofuranosil sucrosa), nistosa (1F(1- β -D-fructofuranosil)₂ sucrosa) y la DP5 (1F(1- β -D-fructo-furanosil)₃ sucrosa). Esto es de mucha importancia ya que, desde un punto de vista alimenticio, los fructooligosacáridos, aunque son fibra soluble, pueden funcionar como prebióticos, es decir como un sustrato metabólico necesario para el crecimiento de la flora intestinal mejorando el proceso de absorción de nutrientes (Benkeblia, 2014).

Los usos que actualmente se les dan a los productos de consumo en el comercio en la mayoría de los casos se centran en la parte aprovechable o digerible, que en el caso del ackee es el arilo. La caracterización química previamente indicada, así como la diversidad de metabolitos presentes y su distribución en distintas partes de la planta permite proyectar el aprovechamiento de otras partes que normalmente son considerados desechos, es así como mediante estudios de esta naturaleza se puede cambiar el paradigma desde una economía menos lineal hacia una economía más circular.

Economía Circular

La economía circular (EC) es un paradigma que pretende generar prosperidad económica, proteger el medio ambiente y prevenir la contaminación, promoviendo así desarrollo sostenible. Esta, se ha vuelto cada vez más importante alrededor del mundo, especialmente en países como Alemania, China y Japón (Ogunmakinde, 2019).

Actualmente, el sector agropecuario costarricense a traviesa un importante reto en la gestión de sus residuos orgánicos provenientes del procesamiento de frutas y vegetales, mayoritariamente bajo una estructura de economía lineal donde el 50% de las fincas de producción no cuentan con tratamientos, dando como resultados el incremento en las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) uno de los principales factores que originan el aumento a largo plazo de la temperatura atmosférica o calentamiento global. Por esto y más, la economía circular no sólo se muestra como una alternativa para reducir desechos orgánicos, sino a su vez, crear un valor agregado a los mismos (Suárez, 2022).

Por consiguiente, el considerar a la EC como una solución ante estas problemáticas podría desencadenar en aspectos como la creación de empleo y el crecimiento socioeconómico. Cabe mencionar que, a nivel mundial, los conocidos Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) presentan a la EC como uno de los únicos modelos que pueden ayudar a reducir la desigualdad y erradicar la pobreza en muchos países, especialmente desde una visión post COVID-19 (Ridaura, 2020).

Sumado a lo anterior, es importante destacar que a nivel mundial se han realizado muchos esfuerzos para mejorar el sistema económico y reducir la producción de residuos en el sector agroalimentario por lo cual la comunidad científica ha estado participando en la investigación del uso de desperdicios de alimentos de toda la cadena de suministro para producir productos innovadores (Esposito et al., 2020).

De esta manera, varios enfoques sostenibles tienen como objetivo la reutilización de los desechos del procesamiento de alimentos y los desechos agrícolas, algunos de los cuales transforman los desechos orgánicos en productos biológicos de valor diversificado, para dirigirse a todas las partes interesadas a lo largo de toda la cadena de suministro hasta el consumidor, para adoptar procesos más sostenibles con menores impactos en el medio ambiente y la salud humana (González & Pomar, 2021).

En cuanto a iniciativas públicas de economía circular en América Latina, Costa Rica al igual que otros países como Perú, Ecuador, y Argentina, han demostrado un bajo nivel en cuanto a la optimización y rendimiento de sus recursos como es mostrado en el cuadro 3 (Garabiza et al., 2021). Por ende, es de gran importancia aprovechar de una mejor manera los residuos o desechos, producto de la gran variedad de frutas y verduras existentes en la zona costarricense para mejorar el sistema productivo y así generar beneficios ambientales, sociales y económicos.

Tabla 3

Iniciativas públicas de economía circular en América Latina.

País	Total	País	Total
Chile	17	Colombia	3
Perú	8	Puerto Rico	3
Ecuador	7	Rep. Dominicana	3
Argentina	6	Bolivia	2
Costa Rica	5	México	2
El Salvador	4	Nicaragua	2
Panamá	4	Cuba	1
Paraguay	4	Guatemala	1
Uruguay	4	Honduras	1
Brasil	3	Venezuela	0

Nota. La aplicación del modelo de economía circular en Ecuador: Estudio de caso (p. 228), por Garabiza et al., 2021. Espacios.

3. Marco Metodológico

Obtención y preparación de las muestras

Para el presente estudio se utilizó una variedad de ackee (*B. sapida*), la cual fue colectada en fincas dedicadas al cultivo de esta planta en el cantón de Matina, específicamente en el poblado de Corina, localizado en la provincia de Limón (10°00'13''N, 83°18'40''W) (figura 6).

Figura 6

Ubicación geográfica del sitio de colecta de *B. sávida* para el estudio.

Recolección de la muestra

Provincia: Limón
Cantón: Matina
Pueblo: Corina

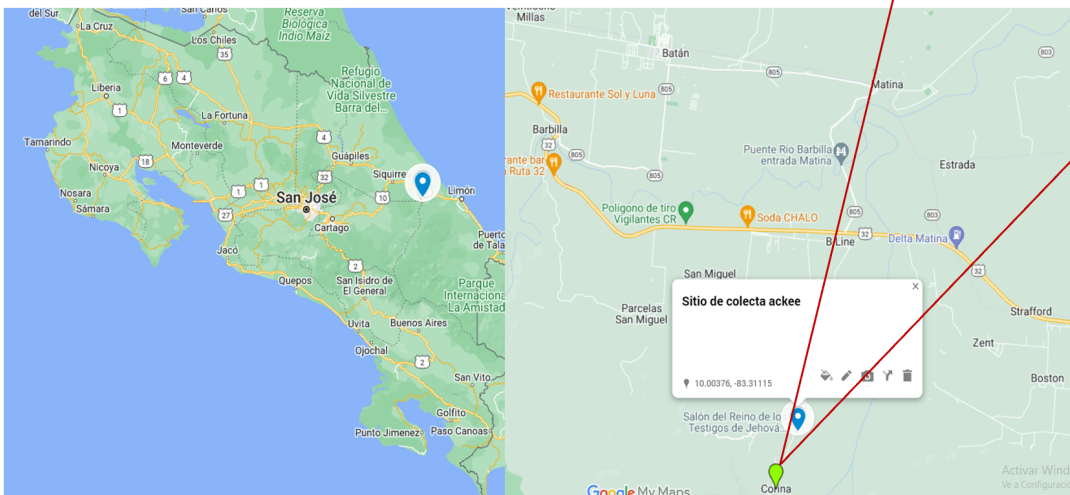
Fruto maduro e inmaduro
(*exocarpio*, *arilos*), Tallos, Hojas

Limpieza

Congelación -30 °C

Liofilización

Molienda tamiz 1mm



Nota. Fuente: Google maps. Elaboración propia.

Se colectaron frutos en estado maduro y verde, hojas y tallo. Las muestras se transportaron en hieleras al Laboratorio de Fitoquímica (LAFIT) de la Escuela de Química de la Universidad Nacional. En el laboratorio las muestras de exocarpios y arilos se limpiaron, congelaron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se secaron empleando la técnica de liofilización mediante un liofilizador marca Labconco 2.5 L Plus. Una vez liofilizadas, las muestras secas se molieron en un molino de cuchillas Thomas Wiley, con un tamiz de 1 mm.

Elección del disolvente para realizar la extracción de polifenoles

Para realizar los ensayos posteriores de antibiogramas, cantidad de polifenoles y actividad antioxidante, primero se determinó el mejor disolvente para hacer las extracciones. Los disolventes que se probaron fueron: acetona:agua en una relación (7:3), acetona:metanol:agua en una relación (4:4:2), acetona:etanol:agua en relación (5:4:1), metanol:agua en una relación (7:3) y acetona:metanol en una relación (1:1) (v/v). Cada extracción se hizo por triplicado colocando en un tubo de ensayo para centrífuga 300 mg de muestra seca y 3 mL del disolvente, se procedió a colocarlo en un baño sónico por 5 minutos, luego se centrifugó a 3800 rpm por 3 minutos en una centrifuga marca DragonLab, modelo DM0412, y seguidamente se decantó. Con el líquido decantado y combinado con las otras dos extracciones de la misma muestra se aforaron en un balón de 10 mL. El rendimiento de extracción se evaluó empleando el método de Folin-Ciocalteu para el contenido de polifenoles totales (Oloyede et al., 2014). El análisis se realizó con tres réplicas a una muestra compuesta de cada parte del fruto.

Determinación del número óptimo de extracciones sobre la muestra

Después de haber elegido el mejor disolvente, se determinó el número óptimo de extracciones. Para este ensayo se utilizó también una muestra compuesta de las distintas partes del fruto (arilo y exocarpio) y se analizó por triplicado. Se realizaron de una a cinco extracciones, usando un tubo de ensayo para centrífuga con 300 mg de muestra seca y 2 mL del disolvente seleccionado previamente, se colocó en un baño sónico por 5 minutos, luego se centrifugó a 3800 rpm por 3 minutos en una centrifuga marca DragonLab, modelo DM0412, y se decantó. Cada extracto sobre la misma muestra se colocó en un balón aforado de 10 mL, luego de las extracciones

se aforó con el disolvente de extracción. La eficiencia del número de extracciones se evaluó empleando el método de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido de polifenoles totales (Garcia et al., 2010).

Determinación del contenido de polifenoles totales

La determinación de polifenoles totales se realizó mediante el uso de un lector de microplacas Synergy HT Multi-Mode marca Biotek usando una microplaca de 96 pozos empleando el método Folin-Ciocalteu (Arranz et al., 2009). Este método es ampliamente utilizado en matrices alimenticias dado que presenta múltiples ventajas como ser rápido, preciso, reproducible y requiere pequeñas cantidades de muestra lo que reduce el tiempo de análisis.

Se realizó tomando 300 mg de muestras previamente liofilizadas y molidas a 1 mm y extrayéndolas mediante 3 extracciones de 3 mL con acetona:agua (7:3). Los tres extractos se combinaron hasta alcanzar un volumen aproximado de 9 mL, para luego aforarlos a 10 mL en un balón aforado empleando el mismo solvente. Para la lectura en el lector de microplacas se procedió de la siguiente manera con el llenado de los pozos: se adicionó 200 μ L de agua, 15 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 30 μ L de muestra y 50 μ L de disolución de carbonato de sodio al 20 % con agitación media por 10 segundos de la microplaca después de la adición de la disolución de carbonato de calcio (Cortez et al., 2018). El reactivo de Folin-Ciocalteu produjo una coloración a la cual se le realizó una lectura a una longitud de onda de 755 nm para obtener la absorbancia. El patrón que se utilizó fue el ácido gálico como estándar para la curva de calibración. El agua destilada se utilizó como blanco. Cada disolución estándar y muestras fueron hechas por triplicado y luego analizadas contra el control negativo(disolvente). En la misma placa con una programación de agitación e incubación térmica a 40 °C se depositaron las muestras, los blancos de reactivos, las repeticiones, y los patrones de las curvas de calibración, seguidamente se adicionó la base y al pasar 20 minutos se realizó la lectura (Cuellar et al., 2013).

Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos crudos de ackee

La actividad antioxidante se determinó por el método de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés), se usó la metodología descrita por (Sánchez et al., 2013). Se utilizó un lector de fluorescencia Synergy HT Multi-Mode marca Biotek de microplacas de 96 pozos. La reacción se llevó a cabo en buffer fosfato 75 mM (pH 7,4), con un volumen final de mezcla de 200 μ L por pozo. Se utilizaron disoluciones de 20 μ L de muestra antioxidante y 120 μ L de fluoresceína (FL) 116,7 nM, las cuales se colocaron en los pozos. La muestra se pre incubó por 15 minutos a 37 °C. Se adicionaron rápidamente 60 μ L de una disolución de AAPH (2, 2'- azobis- 2- metil- propanimidamida-dihidroclórico) 40 mM utilizando una pipeta multicanal. Las microplacas se colocaron inmediatamente en un lector de fluorescencia haciendo lecturas cada minuto por 60 minutos. Se emplearon filtros de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 528 nm (Brescia, 2012). Las microplacas fueron previamente agitadas automáticamente antes de cada lectura. Se utilizó un blanco compuesto por fluoresceína (FL) de sodio más AAPH en el cual se utilizó buffer fosfato en lugar de disolución antioxidante. Como patrones para la curva de calibración de referencia de antioxidante se usaron seis disoluciones de Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico en buffer fosfato) de Trolox en buffer fosfato (de 100, 75, 50, 25, 12,5, 6,25, μ M) (Dudonné et al., 2009). Todas las mezclas de reacción se prepararon por duplicado, y al menos tres ensayos independientes se realizaron para cada muestra incógnita. Las curvas antioxidantes (fluorescencia contra tiempo) se normalizaron primero a la curva del blanco correspondiente al mismo ensayo multiplicando el dato original por un factor $\text{fluorescencia}_{\text{blanco},t=0} / \text{fluorescencia}_{\text{muestra},t=0}$. Utilizando las curvas normalizadas, el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia (AUC) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

donde f_0 es la fluorescencia inicial leída a 0 minutos y f_i es la fluorescencia leída al tiempo i . El área bajo la curva AUC neta se estimó restando el AUC correspondiente al blanco. Las ecuaciones normalizadas entre AUC neta y la concentración de antioxidantes se calcularon para todas las

muestras. Los valores de ORAC-FL se expresaron como equivalentes de Trolox por medio de la curva estándar calculada para cada ensayo. Los resultados finales fueron expresados en μmol equivalentes de Trolox por gramos de muestra seca ($\mu\text{mol ET/gMS}$).

Diseño de análisis de datos

Los análisis se realizaron al menos por triplicado usando el software RStudio para analizar los resultados obtenidos y determinar resultados significativamente diferentes o semejantes. Para analizar el mejor disolvente de extracción y concentración de polifenoles totales se realizó un análisis de ANOVA y la prueba de medias de Tukey ($p < 0,05$) para compararlas entre sí. Se emplean letras distintas para designar resultados estadísticamente diferentes.

Antibiogramas a través del método de difusión en agar por pozos utilizando las bacterias ESKAPE

La actividad antimicrobiana contra las bacterias SKAPE se realizó mediante el método de difusión en agar por pozos. Para este ensayo se realizó una suspensión con cada una de las bacterias, la cual se ajustó a un 0.5 McFarland (Stella et al., 2012) utilizando un DensiCHEK plus Instrument (VITEK 2 Systems), en solución salina esteril NaCl 0.85%. Luego, se colocó un volumen de 100.00 μL de la suspensión bacteriana con una micropipeta (Eppendorf) en placas Petri individuales, y posteriormente se vertieron 25 mL de agar Mueller-Hinton fundido y enfriado a menos de 45 °C (Ordoñez, 2020).

Después de solidificadas las placas, se perforaron 4 pocillos de 6 mm de diámetro equidistantes en el agar con una pipeta Pasteur estéril (Juan Horna-Reátegui et al., 2020). Se colocaron 50 μL del extracto a analizar en tres de los cuatro pocillos, en el cuarto pocillo se colocaron 50 μL de control negativo compuesto por acetona:agua 70:30. Con respecto a la evaluación del control positivo, se perforaron 4 pocillos, tres de los cuales contenían el microorganismo con dicho control positivo de 50 μL (coctel Penicilina/Estreptomina 1000 $\mu\text{g/mL}$), siendo el cuarto pocillo designado para el control negativo con 50 μL del solvente. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Para evaluar efecto inhibitorio de los extractos se prepararon tres concentraciones distintas de 10.00, 5.00 y 2,5.00 mg/mL siguiendo la metodología antes descrita.

Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C y luego se midieron los diámetros de los halos de inhibición para determinar el efecto inhibitorio de cada uno los cinco extractos. Este ensayo se realizó por triplicado.

4. Resultados

Optimización de las condiciones de extracción

Los disolventes utilizados en estudios bioprospectivos cumplen un papel fundamental en la extracción de los metabolitos secundarios debido a que deben garantizar los mejores rendimientos posibles. Parte de la eficiencia en el poder extractivo se debe a las fuerzas intermoleculares que resultan como consecuencia de las afinidades en términos de la polaridad entre solutos y disolvente. Los polifenoles de interés en este estudio son compuestos altamente polares y solubles en agua (Mallco & Rivera, 2020) por lo cual las mezclas utilizadas cumplen esta condición. Para efecto de resumir información los solventes fueron codificados con un sistema alfanumérico como se indica en el cuadro 4.

Tabla 4

Sistema de disolventes utilizados para valorar el poder extractivo de polifenoles totales en B. sapida.

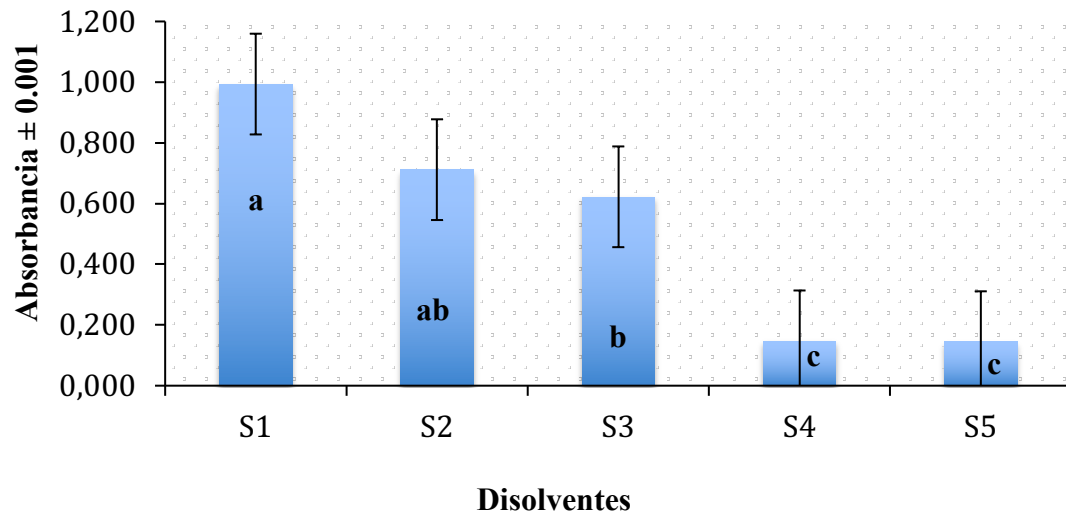
Sistema de solventes utilizados	Proporción en relativa en volumen (V/V)	Código alfanumérico utilizado
Acetona:agua	7:3	S1
Acetona:etanol:agua	4:5:1	S2
Acetona:metanol:agua	4:4:2	S3
Etanol	95% en agua	S4
Metanol:agua	7:3	S5

El poder extractivo se determinó mediante ensayos de Folin-Ciocalteu a una muestra compuesta de arilos maduros de ackee utilizando tres extracciones como referencia, con los sistemas de disolventes anteriormente indicado (S1-S5). En la figura 7 se reportan los resultados obtenidos. Por simplificación, dichos resultados son expresados en términos de las absorbancias absolutas de

la muestra compuesta, en lugar del contenido de polifenoles totales (PFT), lo cual es efectivo en tiempo y recursos dado que la absorbancia es directamente proporcional a los PFT, además es una forma válida dado que para todas las muestras se usó la misma masa. En este sentido los principales hallazgos estadísticos son los mismos utilizando las absorbancias o los PFT. La estadística permite comprobar que los solventes S1 y S2 son los mejores en cuanto a su poder extractivo sin diferencias significativas entre ellos, S1 es diferente significativamente a S3, S4 y S5, mientras que S2 semejante a S3, pero distinto de S4 y S5 (figura 6), siendo estos dos últimos los peores solventes para extracción. Su comprobación se realizó mediante la comparación de medias y análisis de varianza (ANOVA) con prueba de Tukey ($p < 0,05$). Dado que existían dos opciones igualmente eficientes (S1 y S2), para efectos del resto del procedimiento se seleccionó S1 acetona:agua (7:3) como solvente de extracción según criterios del investigador en los cuales se resalta la facilidad de preparación, inversión económica y ventajas experimentales. En este sentido el sistema de solvente S1 es una mezcla binaria mientras que S2 es ternaria y utiliza etanol, lo cual eleva el costo y tiempo de preparación.

Figura 7

Comparación de absorciones medias de una muestra compuesta de arilos de *B. sapida* tratada con el método Folin-Ciocalteu para PFT con diferentes disolventes de extracción.

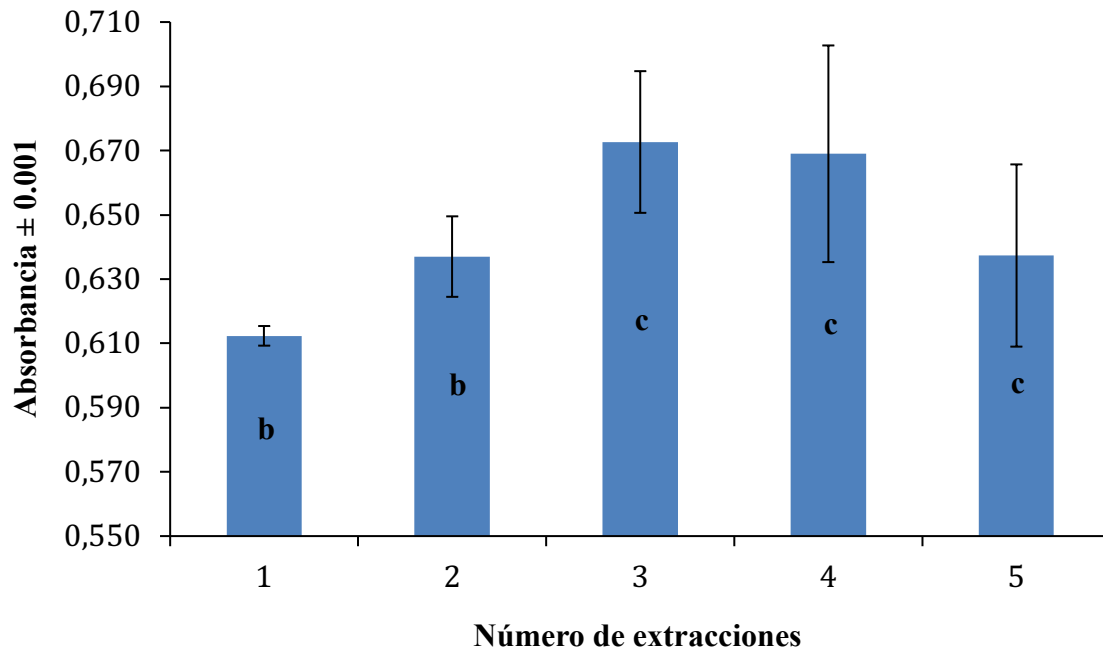


Nota. S1 acetona:agua (7:3), S2 acetona:etanol:agua (4:5:1), S3 acetona:metanol:agua (4:4:2), S4 etanol 95% y S5 metanol:agua (7:3). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Además de las interacciones moleculares que se establecen con el tipo de disolvente, la mejor extracción posible debe considerar el número de extracciones para garantizar no sólo la mayor cantidad de metabolitos de interés obtenidos sino un balance en cuanto al uso de recursos y tiempo de análisis. Los resultados para esta investigación se muestran en la figura 8 utilizando de una a cinco extracciones sucesivas sobre la misma muestra.

Figura 8

Comparación de absorciones medias de una muestra compuesta de arilos de *B. sapida* tratada con el método Folin-Ciocalteu para PFT con diferente número de extracciones.



Nota. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p < 0,05$).

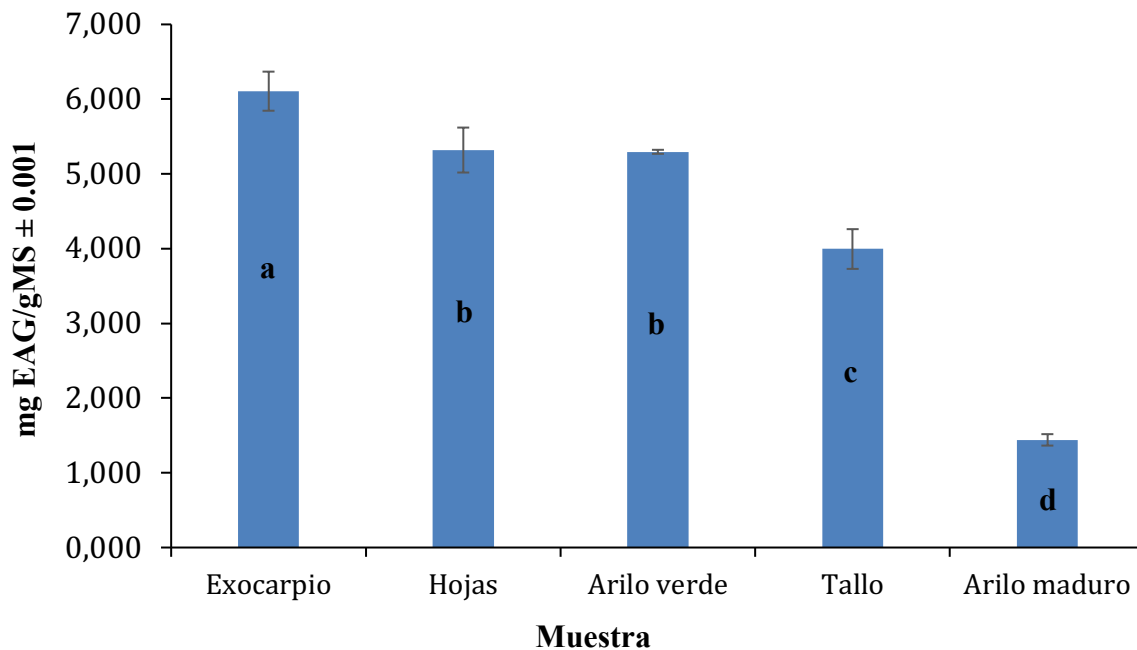
Para efectos de esta investigación se puede afirmar estadísticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) que el límite superior de extracciones es tres, lo cual implica que luego de tres extracciones no se mejora el rendimiento en la obtención del contenido PFT. En otras palabras, tres extracciones es el número óptimo con el solvente S1, más de tres extracciones solo implicaría consumo adicional de solvente, lo cual repercute en el tiempo y gasto de recursos económicos.

Contenido de polifenoles totales en *B. sapida*.

Por esta razón se analizaron los arilos en dos estados de maduración, así como el exocarpio, los tallos y las hojas. Los resultados (figura 9) se obtuvieron bajo las condiciones optimizadas explicadas en la sección anterior (S1 y tres extracciones sucesivas). Los datos se presentan como el contenido de miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/gMS) y en el grado de precisión que las incertidumbres en las mediciones permitieron obtener. Adicionalmente, para una mejor visualización de los resultados los datos se ordenaron descendientemente.

Figura 9

*Distribución de la cantidad de polifenoles totales (PFT) en *B. sapida* en diferentes partes de la planta determinadas por el método Folin-Ciocalteu.*



Nota. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p < 0.05$)

En la figura 9 se muestra que, según las pruebas estadísticas, el contenido mayor de PFT se encuentra en el exocarpio (6.107 ± 0.262 mg EAG/gMS) que es la cubierta que recubre el fruto, como valor medio en el fruto, el promedio fue 4.431 mg EAG/gMS lo cual en general se puede considerar un valor relativamente alto en comparación con *B. sapida* analizada en otras latitudes como Jamaica (0.448 mg EAG/gMS) (Sybron et al., 2019), y con respecto a otras muestras alimenticias como moras (4.388 mg EAG/gMS) (Sánchez et al., 2019).

En cuanto a otras fuentes de polifenoles en ackee, de la figura 9 resaltan las hojas y el arilo verde, sin diferencias significativas entre ellas, y en tercer lugar el tallo. Tanto hojas como tallos fueron incluidos en este estudio para contar con información sobre la distribución general de los PFT en toda la planta, sin embargo, en cuanto a su aprovechamiento claramente sería menor dado que su eventual uso implicaría perder estructuras vitales para el funcionamiento vegetal y por consiguiente la destrucción total o parcial de su productividad al descender biomasa. Otro aspecto sumamente interesante es lo que sucede al arilo como parte comestible en cuanto al contenido de PFT, es significativamente menor por un factor de casi cinco veces el arilo maduro (1.440 ± 0.077 mg EAG/gMS) respecto al arilo verde (5.295 ± 0.027 mg EAG/gMS).

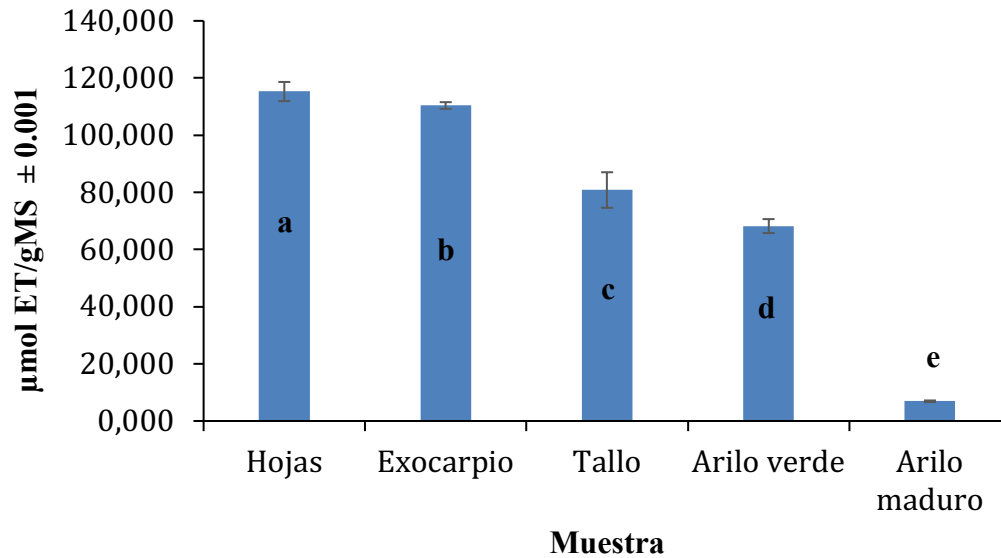
Potencial antioxidante de *B. sapida*.

Como estándares antioxidantes de referencia, el más común es el trolox, por tal motivo los resultados se reportan como micro moles equivalentes de trolox por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol ET/gMS}$).

En la figura 10 se muestran los valores promedio de la capacidad antioxidante de las distintas partes de la planta de *B. sapida* analizadas. En primera instancia, cabe señalar que el valor promedio de la actividad antioxidante fue de $76.316 \mu\text{mol ET/gMS}$ el cual puede ser considerado relativamente alto en comparación con *B. sapida* proveniente de Kingston, Jamaica (0.448 mg EAG/gMS) (Sybron et al., 2019). Por otro lado, las hojas son las que presentaron mejores propiedades antioxidantes con un valor de $115.281 \pm 3.334 \mu\text{mol ET/gMS}$ mientras que el de menor actividad es el arilo maduro con $6.903 \pm 0.278 \mu\text{mol ET/gMS}$, este resultado, es parcialmente consistente con el contenido de polifenoles totales. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las hojas y el resto de las otras partes de la planta, siendo de hecho todas las partes significativamente diferentes entre sí (ANOVA, tukey, $p < 0.05$).

Figura 10

Capacidad antioxidante en las muestras de *B. sapida* determinadas empleando el método de ORAC.



Nota. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p < 0.05$).

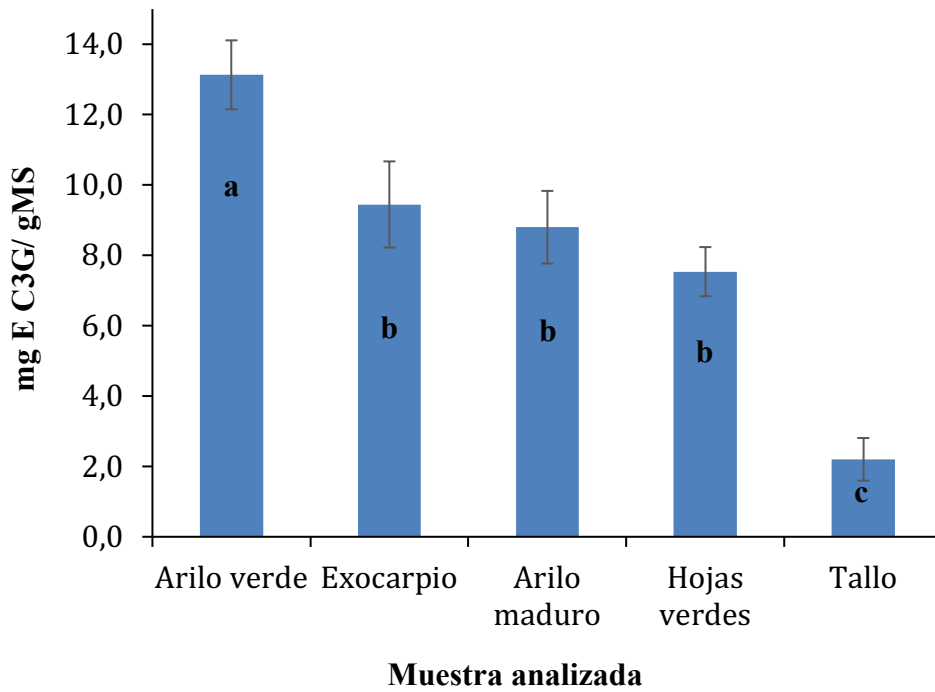
Contenido de antocianinas totales

Los cálculos en este apartado en respuesta a la absorción de energía a distintas longitudes de onda se comparan con el patrón de Cianidina y se reportan en función a este. Por tal motivo en la cantidad de antocianinas totales se expresan como miligramos equivalentes de cianidina 3-glucósido por gramo de muestra seca (mgE C3G/gMS).

EL perfil de distribución de antocianinas en distintas partes de la planta de *B. sapida* puede apreciarse en la figura 11, en la que se han organizado las barras de mayor a menor para una mejor visualización. De acuerdo con los resultados el contenido de antocianinas totales promedio en la planta es notoriamente alto (8.423 mgE C3G/gMS) si se compara con algunos frutos típicamente conocidos por su alto contenido de antocianinas tales como las moras con valores cercanos a 10.5 mgE C3G/gMS (Chaves et al., 2018).

Figura 11

Distribución de la cantidad de antocianinas totales en muestras en B. sapida obtenidas por el método pH diferencial reportadas como equivalentes de cianidina 3-glucósido (C3G).



Nota. Las letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey $p < 0.05$

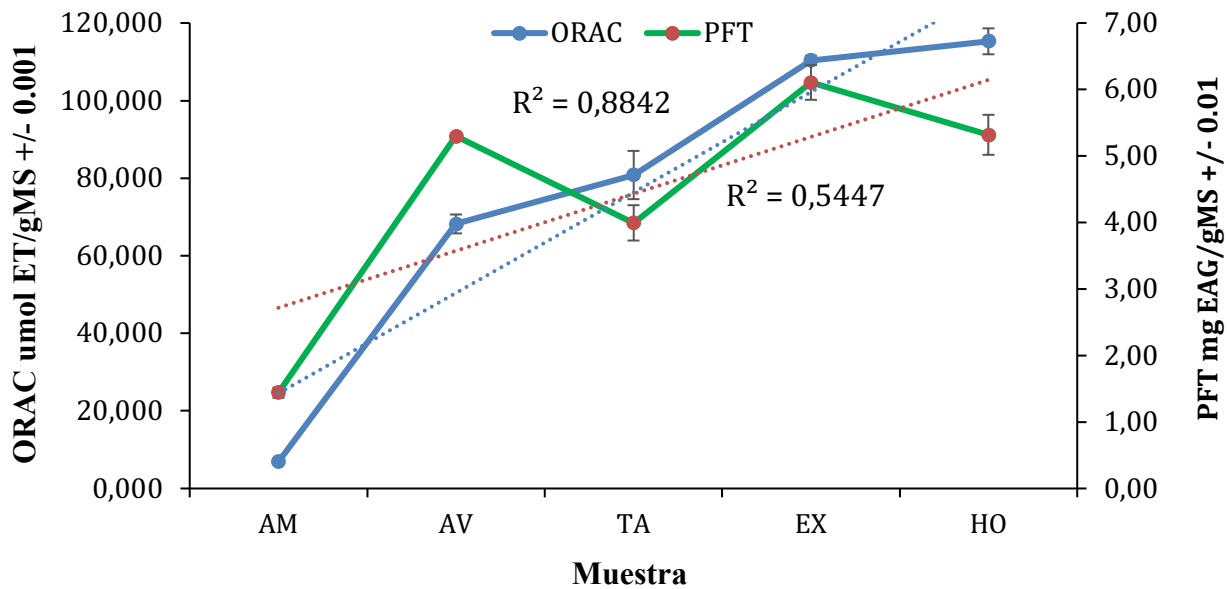
En la figura 11 es posible identificar que la parte de la planta con mayor contenido de antocianinas es el arilo verde (13.130 mgE C3G/gMS) el cual es significativamente superior a las otras partes (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$), seguido en valor absoluto por exocarpio, aunque las pruebas estadísticas muestran que, entre el exocarpio, arilo maduro y hojas verdes no hay diferencias significativas. Por otro lado, el tallo es la parte con menos contenido de antocianinas (2.201 mgE C3G/gMS). Tal como sucedió en el caso de los polifenoles en general, la concentración de antocianinas también decrece con la maduración, el arilo maduro (9.055 mgE C3G/gMS) es casi un 31% menor que el arilo verde (13.130 mgE C3G/gMS), de modo que el efecto es muy marcado y consistente a lo largo de este estudio.

Correlaciones entre metabolitos y su efecto antioxidante

En esta investigación se pudo determinar el potencial antioxidante de *B. sapida* resaltando de manera particular el exocarpio como parte no comestible según los resultados obtenidos. No obstante, se vuelve necesario analizar cuáles son los componentes principales que contribuyen a dicho potencial. Por tal motivo se realizaron análisis de tendencias por métodos gráficos y métodos estadísticos, por ejemplo, la figura 12 es un gráfico de doble entrada en el cual se muestra la variación en la capacidad antioxidante (ORAC) y los polifenoles totales (PFT) según la parte de la planta ordenadas en forma ascendente.

Figura 12

Tendencias en las variaciones de la capacidad antioxidante (ORAC) y los polifenoles totales (PFT) en distintas partes de la planta de B. sapida.



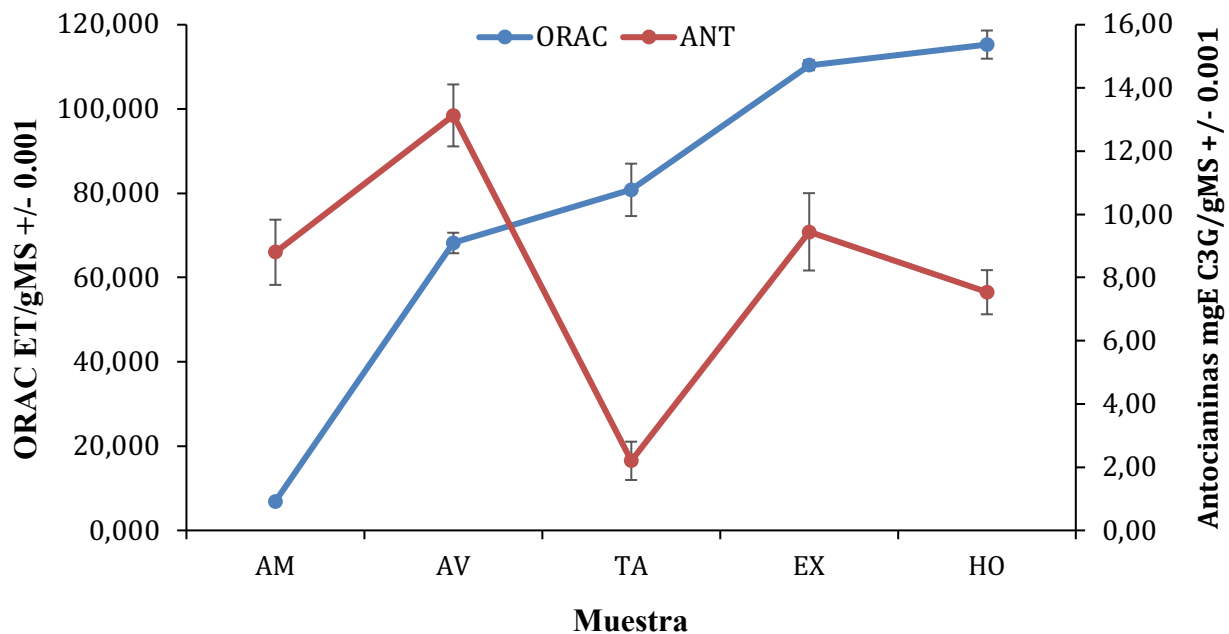
Nota. AM es arilo maduro, AV arilo verde, TA tallo, EX exocarpio y HO hojas.

De acuerdo con la figura 12 se puede observar que en términos generales los incrementos en los PFT conllevan a un mayor efecto antioxidante con una relación aproximadamente lineal. Tal como se puede ver la linealidad no es perfecta en las líneas de mejor ajuste por mínimos cuadrados, no obstante, es clara la correlación entre estas dos variables. En tal sentido se puede afirmar que los polifenoles son responsables en gran medida de la capacidad antioxidante, no necesariamente los únicos que aportan, pero si los más importantes. Este resultado no es sorprendente sino más bien el esperado según la literatura científica disponible, dado que existen numerosos estudios previos que han logrado demostrar esta dependencia (Ordoñez et al., 2019).

En el gráfico 13 se muestra la tendencia de variación de las antocianinas totales (ANT) en distintas partes de la planta y su comparación con la capacidad antioxidante en las mismas partes a fin de apreciar visualmente si hay dependencia.

Figura 13

Tendencias en las variaciones de la capacidad antioxidante (ORAC) y los polifenoles totales (PFT) en distintas partes de la planta de B. sapida.



Nota. AM es arilo maduro, AV arilo verde, TA tallo, EX exocarpio y HO hojas.

Para el caso de las antocianinas la variación en las partes de la planta es mucho más irregular, lo cual indica que las antocianinas, aunque si aportan al efecto antioxidante no son las más importantes.

La interpretación estadística se puede realizar analizando comparaciones numéricas múltiples de dos variables a la vez mediante el estadístico de Pearson $p < 0.05$. Los resultados de tales pruebas se muestran en el cuadro 5.

Tabla 5

Relaciones estadísticas obtenidas entre las variables de análisis antioxidante en B. sapida determinadas mediante el coeficiente de Pearson R^2 .

	ORAC	PFT	ANT
ORAC	1	0.824	0.017
PFT	0.824	1	0.051
ANT	0.017	0.051	1

Notas. PFT, ANT y ORAC corresponde respectivamente a polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

Tal como se puede apreciar en el cuadro 5, las variables PFT y ORAC están relacionadas estadísticamente ($R^2 = 0.824$) lo cual se considera una relación muy fuerte al ser superior a 0.70, esto significa que la capacidad antioxidante depende de la concentración de polifenoles. Por otro lado, no existe relación estadísticamente significativa entre ANT y ORAC ($R^2 = 0.017$), la correlación es tan baja que se puede afirmar que el efecto antioxidante fundamentalmente proviene de otro tipo de compuestos fenólicos que no son antocianinas. Adicionalmente el estudio permitió determinar que tampoco existe correlación estadísticamente significativa entre los PFT y ANT ($R^2 = 0.051$), lo cual indica que no necesariamente al haber más polifenoles totales habrá mayor contenido de antocianinas.

Efecto antibiótico en bacterias ESKAPE

Tal como se ha señalado, las bacterias utilizadas en este estudio con el acrónimo ESKAPE constituyen patógenos frecuentes en humanos y por tanto la búsqueda de nuevos antibióticos se vuelve fundamental para su combate(Guevara, 2021).

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos indicando los valores promedio en los halos de inhibición y sus respectivas desviaciones estándar (SD) como medida de la dispersión de los datos. Tal como puede apreciarse rápidamente la parte del fruto que menos actividad tiene es el fruto maduro, que de hecho no presentó actividad alguna contra ninguna de las bacterias. El cuadro 6 tiene por propósito mostrar los datos absolutos a fin de que puedan estar disponibles para futuros estudios comparativos cosa que puede perderse cuando se usan sólo los gráficos con las tendencias. Sin embargo, para efectos de una visualización más rápida de los efectos acumulativos se presenta la figura 10, en la cual se graficaron los resultados para la mayor concentración (alícuota), para las otras concentraciones de extractos los resultados pueden ser consultados en el cuadro 6 y no a modo de gráficos por dos razones: 1) siguen la misma tendencia que la figura 13 y 7) sería un gráfico muy similar que haría muy reiterativo el documento.

Tabla 6

Actividad antibiótica medida en las bacterias ESKAPE.

Extracto	Concentración (mg/mL)	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. faecium</i>	
		Halo (mm)	SD	Halo (mm)	SD	Halo (mm)	SD	Halo (mm)	SD	Halo (mm)	SD	Halo (mm)	SD
Arilo maduro	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Arilo verde	10.00	12.33	0.58	11.00	0.00	12.00	0.00	12.00	0.00	12.00	0.00	11.00	0.00
	5.00	10.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00
	2.50	8.00	0.00	8.00	0.00	7.00	0.00	8.00	0.00	3.00	0.00	8.00	0.00
Tallo	10.00	19.00	0.00	15.00	0.00	19.00	0.00	17.00	0.00	15.00	0.00	18.00	0.00
	5.00	15.33	0.58	13.00	0.00	15.00	0.00	14.00	0.00	13.00	0.00	11.00	0.00
	2.50	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00

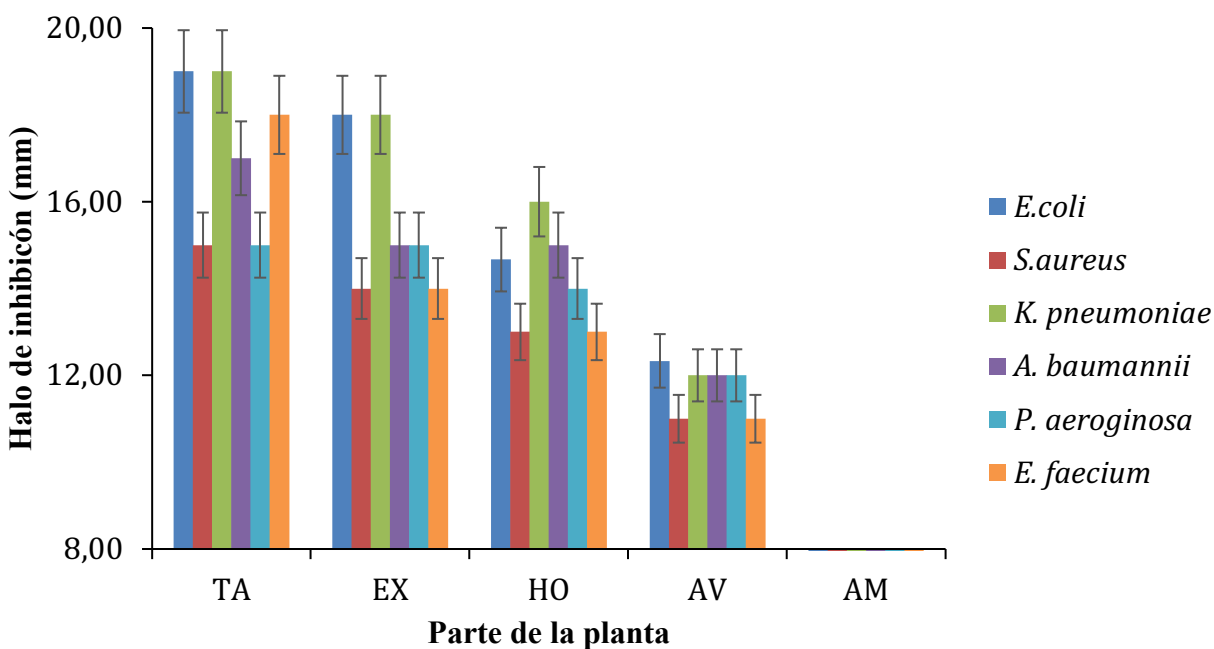
Continua tabla...

Hojas verdes	10.00	14.67	1.15	13.00	0.00	16.00	0.00	15.00	0.00	14.00	0.00	13.00	0.00
	5.00	11.33	0.58	11.00	0.00	12.00	0.00	11.00	0.00	11.00	0.00	11.00	0.00
	2.50	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00	9.00	0.00
Exocarpio	10.00	18.00	0.00	14.00	0.00	18.00	0.00	15.00	0.00	15.00	0.00	14.00	0.00
	5.00	13.00	0.00	12.00	0.00	14.00	0.00	12.00	0.00	13.00	0.00	12.00	0.00
	2.50	11.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00	10.00	0.00

Nota. Los milímetros son respuesta a extractos de distintas partes de la planta *B. sapida* a tres diferentes concentraciones. Fuente: Elaboración propia.

Figura 14

Tendencias en la respuesta antibiótica por halo de inhibición (mm) en las bacterias ESKAPE como consecuencia de la exposición a extractos de distintas partes de B. sapida de concentración 50 mg/mL.

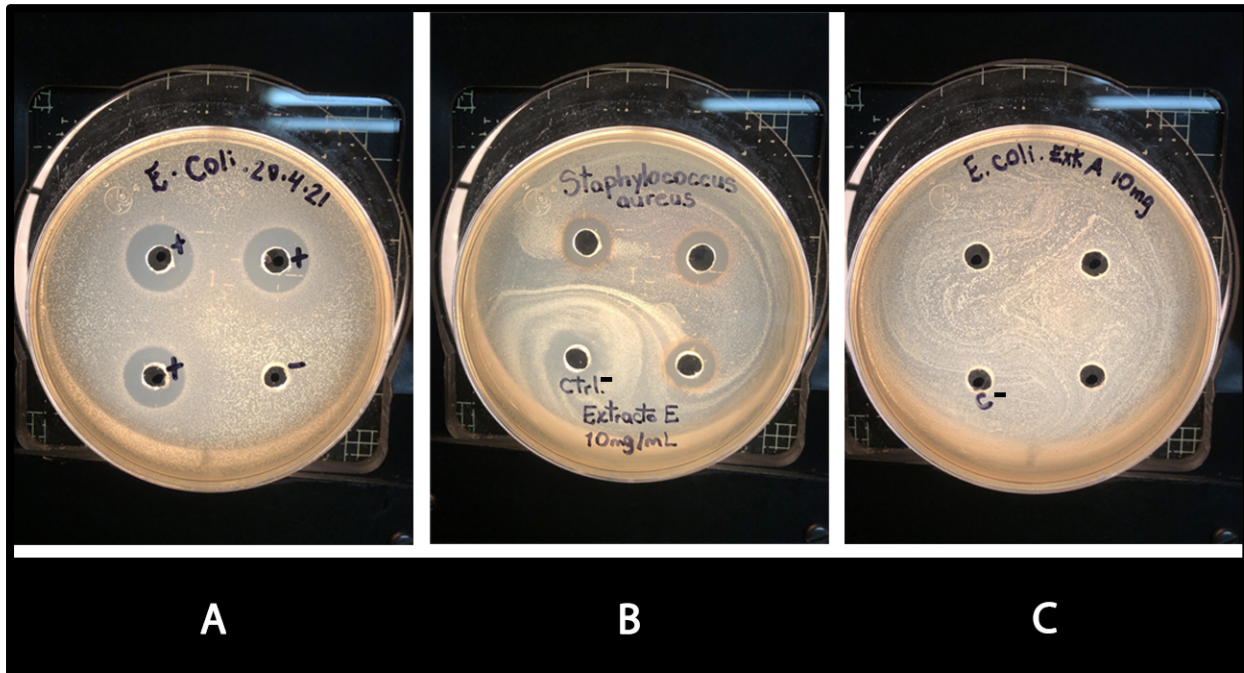


Nota. AM es arilo maduro, AV arilo verde, TA tallo, EX exocarpio y HO hojas. El AM sin respuesta antibiótica. El control negativo Acetona:H₂O 7:3 no tuvo efecto antibiótico por lo cual no se refleja en la presente figura.

De acuerdo con las tendencias observables de la figura 14, las partes con menos efecto sobre las bacterias son el arilo maduro (nulo) y el arilo verde en segundo orden de menor a mayor. En cuanto a las partes con mayor efecto antibiótico se puede afirmar que son el tallo y el exocarpio, de hecho, en un ensayo de superposición gráfica los datos obtenidos entre estas dos partes de la planta en cada bacteria es prácticamente el mismo, sin diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$). La figura 15 muestra algunos resultados relevantes en cuanto a la formación de halos de inhibición bajo el efecto antibiótico del extracto crudo del exocarpio (EX) de *B. sapida*, el efecto nulo del extracto de arilo maduro (AM), en comparación del efecto presentado por parte del control positivo de Penicilina/Estreptomicina (Anexo 2).

Figura 15

Resultados obtenidos en la medición del diámetro del halo de inhibición.

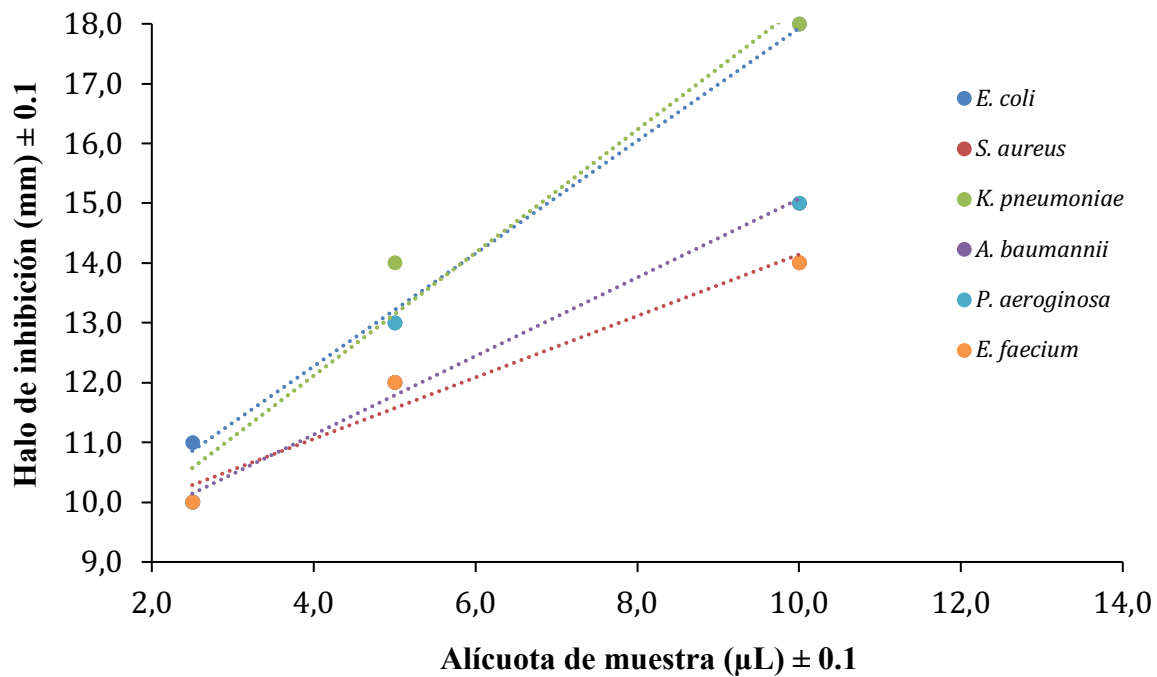


Nota. A) Control positivo (+) y control negativo (-). B) Halos de inhibición resultado del extracto de exocarpio (EX) a 10mg/mL de concentración ante la bacteria *S. aureus*. C) Efecto antibiótico nulo del extracto de arilo maduro (AM) a 10mg/mL de concentración ante la bacteria *E. coli*.

Adicionalmente, con los datos obtenidos se realizó un análisis del efecto de la concentración de los extractos sobre la respuesta antibiótica medida a través de los halos de inhibición, esto a tres diferentes concentraciones de extractos. A modo de ilustración visual de las tendencias en la figura 16 se muestra como ejemplo las líneas de mejor ajuste para las diferentes concentraciones del extracto del exocarpio frente a las seis bacterias ESKAPE.

Figura 16

Efecto antibiótico en las bacterias ESKAPE.



Nota. Efecto medido a través de la formación de halos de inhibición en respuesta a distintas cantidades del extracto del exocarpio de *B. sapida*.

La figura 16 muestra claramente el ajuste lineal del extracto del exocarpio, para las otras partes de la planta la información se puede consultar en el cuadro 7. En dicho cuadro no se incluyeron los coeficientes para el arilo maduro (AM) porque no tuvo actividad sobre las bacterias. Una rápida inspección de los resultados de las correlaciones múltiples de Pearson (R^2) del cuadro 7 permite evidenciar que en general y sin excepciones a mayor concentración mayor es el efecto

antibiótico, esto en general es un resultado muy común, lo que sí es sobresaliente es que los ajustes son casi todos con una linealidad perfecta con coeficientes muy cercanos a uno, con casi un 40% de ellos iguales a la unidad, lo cual indica que los incrementos en la respuesta antibiótica son directamente proporcionales a las concentraciones, esto en todas las bacterias y todas las partes de la planta.

Tabla 7

Coefficientes de correlación de Pearson (R^2).

	AV	TA	HO	EX
<i>E. coli</i>	0.99	0.96	1.00	1.00
<i>S. aureus</i>	1.00	0.95	0.98	0.98
<i>K. pneumoniae</i>	1.00	0.97	0.99	0.98
<i>A. baumannii</i>	1.00	0.96	1.00	1.00
<i>P. aeruginosa</i>	0.93	0.95	1.00	0.95
<i>E. faecium</i>	1.00	0.98	0.98	0.98

Nota. Los coeficientes muestran la relación lineal entre los cambios de concentración de extractos de distintas partes de *B. sapida* en las bacterias ESKAPE. AV: Arilo Verde, TA: Tallo, HO: Hojas, EX: Exocarpio. Fuente: Elaboración Propia.

5. Discusión

Optimización de las condiciones de extracción

Existe suficiente evidencia en la literatura para afirmar que en general es más eficiente hacer extracciones con volúmenes pequeños en varias etapas que con un solo volumen equivalente (Alara et al., 2021). No obstante, luego de un número determinado de extracciones, las etapas sucesivas solo implican consumo de reactivos sin mejorar los rendimientos.

Cabe mencionar que el número óptimo de extracciones aquí obtenido no es extrapolable a otros estudios u otras fuentes alimenticias, debido principalmente a que el tipo de disolvente utilizado puede diferir. No obstante, en la literatura este se considera un valor bastante frecuente reportado en análisis previamente realizados en matrices como maíz (Syedd et al., 2020), mora (Darniadi et al., 2019) y rambután (Phuong et al., 2020).

Contenido de polifenoles totales en *B. sapida*.

En la industria alimenticia, particularmente con los frutos, solo una porción es utilizada en el producto final de consumo. No obstante, los metabolitos secundarios tales como los polifenoles pueden estar distribuidos en muchas partes distintas de la planta sin que necesariamente su concentración mayoritaria esté en la parte del fruto comestible.

Adicionalmente, estudios previos sugieren que el estado de maduración influye en la composición química de los frutos (Soto et al., 2021). En *B. sapida* la parte consumible es el arilo, mientras que las partes externas como el exocarpio, las hojas y el tallo no son aprovechados.

El hecho de que el exocarpio sea el que posee más polifenoles resulta muy importante dado que es una parte del fruto que no se aprovecha. En cuanto a propiedades físicas, la masa del exocarpio constituye, aproximadamente al 50 % del peso total del fruto (Moya et al., 2018). Actualmente, no existen muchas opciones reportadas en la literatura para dar un aprovechamiento a

este subproducto, por lo que se estima que se desecha en la mayoría de los casos, siendo este un alimento de poco uso industrializado o a lo sumo se utiliza como abono orgánico. Tal como este estudio señala, existe un muy buen potencial para los arilos como fuente de polifenoles, los cuales, como han sido ampliamente reportados en la literatura son la base de muchos productos nutracéuticos y funcionales (Origbemisoye & Ifesan, 2021). Por tanto, en este sentido el uso potencial de los arilos para obtener estos metabolitos secundarios puede contribuir a dar valor agregado a este cultivo no tradicional en Costa Rica, y por consiguiente aportar en la conceptualización hacia una economía circular. Este tipo de economía tiene como base fundamental reducir al máximo posible los desechos y dar mayor aprovechamiento a los componentes en un proceso productivo, lo cual contrasta con la economía lineal donde el modelo productivo implica el suministro de mayores cantidades de biomasa (Carretero, 2022).

Con base en la literatura es bien conocido que el complejo proceso de la maduración implica una sucesión de reacciones químicas que modifica la composición porcentual y el tipo de metabolitos en los frutos, muchas veces como resultado de procesos oxidativos (Sybron et al., 2019), en tal sentido es esperable que haya una reducción en el contenido de los polifenoles totales promovido por la enzima conocida como polifenol oxidasa, responsable del pardeamiento de frutas y vegetales (López et al., 2019).

El hecho de que el arilo maduro sea el que contenga la menor proporción de PFT en comparación con el arilo verde tiene otra implicación adicional, la cual se debe a la particular toxicidad de los arilos en estado verde. Este fruto tiene como característica distintiva que el arilo sólo se puede consumir en estado maduro, lo cual se identifica al momento en que el exocarpio se abre espontáneamente por sí mismo. Si se consumen antes de este momento las concentraciones de hipoglicina A, un tipo de L aminoácido tóxico, produce hipoglucemia o inhibición de la gluconeogénesis, lo que ha llevado a muchas muertes especialmente en niños en África occidental y el Caribe (Olapade et al., 2019). En otras palabras, un eventual uso y aprovechamiento de arilos antes de la apertura de los exocarpios implica la necesidad de analizar si el proceso de extracción permite ser lo suficientemente selectivo para polifenoles como para no incluir las hipoglicinas.

Potencial antioxidante de *B. sapida*.

Los fenómenos de modificación estructural de los compuestos debido a especies reactivas de oxígenos (ROS) tipo radicales libres es bien conocido en la literatura. El desafío fundamental es que estas especies se originan como parte del metabolismo regular de los organismos, especialmente durante los procesos catabólicos como la respiración celular (Lozano & Fernández, 2020). El método ORAC permite medir el efecto de estas ROS mediante el seguimiento cinético en el tiempo del descenso en la concentración de fluoresceína como resultado de la presencia de ROS. Los agentes antioxidantes son aquellos que impiden o limitan el efecto degradativo de las ROS hacia los compuestos orgánicos.

Tal como en el caso anterior donde se analizó PFT, el exocarpio también presenta las características más promisorias como agente antioxidante en ORAC, esto por cuanto es el segundo en importancia ($110.382 \pm 1.176 \mu\text{mol ET/gMS}$) y además porque implica una parte no comestible considerada de desecho y porque es un componente del fruto y a su vez no es parte de la biomasa esencial para la sobrevivencia de la planta en términos productivos. Por otro lado, el arilo maduro es la parte de *B. sapida* con menor actividad antioxidante ($6.903 \pm 0.278 \mu\text{mol ET/gMS}$), lo cual implica una reducción de casi diez veces en su capacidad antioxidante con la maduración. Este hallazgo es particularmente importante puesto que el arilo es la parte de consumo en estado maduro, lo cual lleva a que el aporte nutracéutico en este sentido sea el más bajo posible. Si se priorizan las propiedades antioxidantes, así como la disponibilidad del recurso y las oportunidades de negocios adicionales, el exocarpio ofrece las mejores ventajas estratégicas, lo cual como fue previamente mencionado permite reorientar la producción hacia un mayor aprovechamiento del cultivo y el eventual desarrollo de negocios más verdes o biosostenibles.

Como fue previamente mencionado las ROS son parte de los subproductos del metabolismo, pero también son generados en respuesta a la exposición a agentes químicos o radiaciones ionizantes como rayos UV (Brignone, 2020), por lo cual no es posible evitar su formación, al menos en principio. Dentro de las ROS se encuentran los radicales superóxidos $\text{O}_2\cdot$ y peróxilos $\text{ROO}\cdot$ los cuales son especies muy reactivas y pueden desencadenar efectos mutagénicos al alterar el ADN y causar peroxidación de los lípidos que conforman las membranas celulares

(Carvajal, 2019). Siendo el ackee un fruto muy común en países caribeños como Jamaica donde es un componente esencial de su gastronomía y de la cultura, el enfoque que permite dar mayor valor agregado a su producción sería incorporar otras partes de la planta particularmente el exocarpio por las razones previamente expuestas.

Contenido de antocianinas totales

Existe una gran diversidad de antocianinas en la naturaleza, sin embargo, pese a las variaciones estos metabolitos comparten en común que son compuestos hidrosolubles abundantes y muy variados presentes en las plantas y que cumplen funciones múltiples como protectores contra la radiación UV y atracción de polinizadores (Fuentes-Barría et al., 2018). Tal como se señaló en resultados previos, al ser hidrosolubles el sistema de solventes utilizado en esta investigación (S1) tiene las características apropiadas de polaridad para extraer estos componentes dado que las antocianinas son glúcidos de las antocianidinas (agliconas) (Hurtado & Charfuelan, 2019). No existe una forma única de antocianinas mayoritaria en todos los frutos, sin embargo, una de las más abundantes suele ser la cianidina 3-glucósido, la cual le da color rojizo-azul a los frutos y tiene un potente efecto antioxidante reportado (Rahman et al., 2021). Esta antocianina de la familia de los flavonoides en particular es utilizada como patrón de referencia al momento de reportar los resultados a fin de hacerlos comparables en la literatura científica, pese a que existen otros patrones esta es la más utilizada por lo cual se seleccionó para este estudio.

Este resultado es sobresaliente dado que el ackee es un fruto tradicional que no se comercializa mucho, pero las cosechas son abundantes y de mucho más bajo costo que las bayas y las moras. Si se compara su contenido con otros alimentos de uso más extensivo y cotidiano como el maíz, se aprecia aún más el potencial del ackee. Por ejemplo, en un estudio se determinó que el maíz criollo costarricense posee un contenido promedio de antocianinas de 1.97 mgE C3G/gMS, incluso el de color morado (3.96 mgE C3G/gMS) (Syedd et al., 2020) y no logra superar el contenido en ackee, siendo este último más del doble.

Tal como se ha señalado en la literatura la maduración puede desencadenar cambios estructurales en los metabolitos (Soto et al., 2021) lo cual en este caso afecta tanto a los PFT como

a las antocianinas debido a su similitud estructural dado que las antocianinas también son un subgrupo de los PFT.

Correlaciones entre metabolitos y su efecto antioxidante

Las plantas en general y los frutos en particular pueden tener una composición de metabolitos secundarios muy amplia, de modo tal que sus propiedades farmacéuticas dependen en muchos casos de efectos sinérgicos o aditivos entre varios componentes. No obstante, en algunos casos se ha podido identificar a un solo compuesto responsable de alguna actividad farmacológica y en otros casos a todo un grupo o familia de metabolitos.

El efecto antioxidante de los polifenoles ha sido explicado a través de un mecanismo de extinción de radicales libre (RL) en la que los grupos hidroxilados de los polifenoles juegan un papel fundamental en donde se generan reordenamientos moleculares por resonancia y oxidaciones que hacen al RL menos reactivo, de modo que los antioxidantes interceptan y aminoran o suprimen el impacto de los RL sobre otras moléculas de los tejidos (Mendoza et al., 2020). En el organismo existen algunos antioxidantes generados por el metabolismo, no obstante, con los cambios en la alimentación y el estilo de vida poco saludable de la sociedad actual estos se pueden ser superados por estrés oxidativo desencadenando procesos degenerativos y eventualmente enfermedades, muchas de las cuales pueden resultar mortales. En tal sentido se vuelve fundamental el consumo exógeno de antioxidantes en la dieta.

Cabe recordar que las antocianinas son un tipo o subgrupo de polifenoles del grupo flavónico caracterizados por la presencia del ion flavilio (oxígeno positivo) en un sistema de difenilpiranos altamente conjugado. La resonancia en los anillos de los flavonoides y su grado de conjugación es lo que les permite mostrar esos patrones de coloración característicos y en cierta medida su aporte antioxidante (Zevallos, 2018). Como los resultados indican para el caso de *B. sapida* el tipo de polifenoles que están aportando de manera más importante a la capacidad antioxidante no son las antocianinas sino otros compuestos fenólicos.

Este resultado es en cierta medida poco frecuente dado que es conocido el efecto antioxidante de las antocianinas. Una posible explicación es que las antocianinas encontradas en cada parte difieren en tipo de moléculas, y dado que el análisis de pH diferencial las cuantifica de manera colectiva puede que algunas pese a estar en menor proporción tengan un efecto más potente

en la supresión de radicales libres. No obstante, tal hipótesis requeriría de manera específica el perfil detallado de la mezcla lo cual se escapa de los objetivos de esta investigación.

En otros estudios se han encontrado que estas variables si han estado relacionadas entre sí (Muzolf, 2022) lo que puede ser esperable dado que como se ha indicado las antocianinas son un subgrupo de los PFT, no obstante, cada matriz alimenticia tiene sus particularidades y existen varios aspectos que hacen a la planta de *B. sapida* muy particular, por ejemplo, el hecho de que haya moléculas que no se presentan en otras plantas tal como las hipoglicinas.

Efecto antibiótico en bacterias ESKAPE

Las bacterias son organismos unicelulares que en apariencia son simples pero que presentan una gran adaptabilidad al medio ambiente que les rodea. Su principal estrategia de adaptación es la capacidad de mutar rápidamente, lo cual conlleva a su vez que sean muy resistentes a los antibióticos, los cuales, al pasar del tiempo, pierden su efectividad (Botelho & Schulenburg, 2021).

Este último en particular resulta interesante dado que el arilo estando verde es cuando la concentración de hipoglicinas están en su punto más alto de concentración según estudios previos (Sinmisola et al., 2019). No es posible afirmar categóricamente que las hipoglicinas no tengan efecto antibiótico basados en este estudio, pero sí que hay evidencia que sugiere que el aumento en su concentración no es tan significativo en comparación con otros metabolitos presente, puesto que mayor concentración de hipoglicinas no está significando un mayor efecto antibiótico.

En cuanto a cuáles componentes de la planta pueden ser los responsables del efecto antibiótico, según los alcances de este estudio no es posible afirmarlo, dado que como consecuencia del sistema de solventes utilizado los extractos optimizaron la obtención de polifenoles es esperable también que además de polifenoles haya otros componentes importantes en los extractos. Existen estudios que sugieren que los polifenoles tienen efectos antibióticos (Scicutella et al., 2021), esto parece ser parcialmente consistente con esta investigación dado que dentro de los extractos que mostraron mayor contenido de PFT estaba el exocarpio, mismo que estuvo entre los de mayor efecto antibiótico relativo.

5. Conclusiones

Los componentes antioxidantes en *B. sapida* pueden extraerse en condiciones optimizadas para mejor disolvente tanto con una mezcla acetona-agua en proporción relativa en volumen 7:3 como con mezcla ternaria acetona-etanol-agua (4:5:1). Entre ambas opciones estadísticamente equivalentes en cuanto a su poder extractivo, se prefiere la primera por su facilidad de preparación. Los sistemas de solventes utilizados que no contienen acetona en su preparación dieron rendimientos de cerca del 20% respecto al mejor solvente lo cual los hace inadecuados.

El número óptimo de extracciones de los metabolitos con poder antioxidante en *B. sapida* obtenidos con el sistema de solventes acetona-agua 7:3 es de tres extracciones sucesivas. Luego de tres extracciones no se logra obtener mejor rendimiento en el contenido de polifenoles totales empleando el método de Folin-Ciocalteu.

El contenido de polifenoles totales obtenido de partes de la planta del ackee producido en la zona caribeña de Costa Rica es alto en términos relativos promedio (4.431 mg EAG/gMS) respecto estudios realizados en frutos procedente de otros países como Jamaica (0.448 mg EAG/gMS). Al compararlo con frutos típicamente coloreados y de alto valor comercial como las moras su contenido de polifenoles es similar. Esto aumenta el interés de estudio en cuanto a su valor nutracéutico poco estudiado en el país costarricense, existiendo en la actualidad solamente un estudio de caracterización in situ en el país (Quesada & Barrantes, 2019).

El exocarpio es la parte de *B. sapida* con mayor contenido de polifenoles totales, seguido de las hojas, el arilo verde, el tallo y el arilo maduro. Es muy significativo que el exocarpio siendo la parte desechada del fruto tiene una concentración de polifenoles casi seis veces superior al arilo maduro que es la parte comestible, lo cual sugiere un eventual aprovechamiento de este subproducto que representa cerca del 50% del peso del fruto.

Existe una relación inversamente proporcional entre el estado de maduración del fruto de *B. sapida* y el contenido de metabolitos antioxidantes, lo cual lo vuelve un factor determinante y muy consistente en polifenoles totales, antocianinas y la capacidad antioxidante. En los polifenoles totales la maduración hace descender su concentración en cinco veces al comparar el arilo maduro (fruto abierto) respecto al arilo verde (fruto cerrado). La capacidad antioxidante (ORAC) disminuye

en un factor de diez al comparar arilo maduro y verde. Por otro lado, el contenido de antocianinas se reduce en una proporción cercana al 33%.

Existe una relación estadísticamente significativa de proporcionalidad directa (R^2 de Pearson $p < 0.05$) entre el contenido total de polifenoles (Folin-Ciocalteu) y la capacidad antioxidante (ORAC), no así entre el contenido de polifenoles y el contenido de antocianinas. De igual manera el contenido de polifenoles no demostró una relación con la capacidad antioxidante.

B. sapida no constituye una fuente promisoría en la búsqueda de compuestos con efecto antibiótico contra las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecium* (bacterias ESKAPE), especialmente el arilo maduro que no mostró efecto en ninguna de las bacterias y en ninguna de las concentraciones utilizadas. Comparativamente la parte de la planta con mejor potencial fue el exocarpio. No obstante, aún se considera bajo respecto al patrón positivo de penicilina-estreptomicina.

El exocarpio, en función de los resultados de este presente estudio, se vuelve de gran importancia en cuanto al tema de la economía circular, ya que este es una estructura no comestible que se desecha sin mayor aprovechamiento. La consistencia mostrada en términos del contenido de polifenoles totales y efecto antibiótico por parte de esta estructura hace necesario revalorar este residuo orgánico como potencial beneficio económico y ambiental, principalmente en la recuperación de compuestos bioactivos y la reducción de la contaminación. El eventual aprovechamiento del exocarpio puede incentivar la industria y la investigación para generar mercados potenciales que mejoren las condiciones de vida de las regiones donde se cultiva.

6. Recomendaciones

Aprovechando la actividad antibacteriana mostrada por *B. sapida* con base a los valores obtenidos en cuanto a su potencial antioxidante, se puede valorar y formular productos comerciales que añadan un valor agregado en dirección a una economía circular, que vaya más allá de un alimento que forma parte del arte culinario afrocaribeño.

Se sugiere que un fruto como *B. sapida*, se presente como una alternativa interesante en la búsqueda de nuevas acciones que ayuden a Costa Rica a dar un mayor paso de una economía lineal a una economía circular. Fortaleciendo a su vez, una conexión entre el gobierno, las universidades, las empresas y los ciudadanos de la zona atlántica del país, especialmente porque este árbol en particular se ha ido perdiendo.

Para próximos estudios, se recomienda realizar un análisis de mayor profundidad que involucre la identificación de las distintas variedades o inclusive especies de ackee en función de características fenotípicas, niveles de hipoglicinas A y B presentes, con ayuda de técnicas o metodologías como el tamizaje fitoquímico en busca de moléculas bioactivas como, proantocianidinas(PAC), cumarinas, entre otras, que enriquezcan el valor de este fruto en las distintas áreas de investigación, biotecnológica, química, agronómica y ambiental.

7. Referencias

- Adadi, P., Barakova, N. V., Muravyov, K. Y., & Krivoshapkina, E. F. (2019). Designing selenium functional foods and beverages: A review. *Food Research International*, *120*, 708–725. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.029>
- Adebayo, M. A., Adebomi, J. I., Abe, T. O., & Areo, F. I. (2020). Removal of aqueous Congo red and malachite green using ackee apple seed–bentonite composite. *Colloids and Interface Science Communications*, *38*(August), 100311. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100311>
- Aguirre Gómez, B., Bárcena López, J. A. P., Díaz Villanueva, A., Hernández Gómez, G., & Lázaro Santamaría, S. Q. (2021). Guía de obesidad en pediatría para Primer y Segundo Nivel de Atención Médica (Primera parte). *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, *30*(3), 72–90. <https://doi.org/10.35366/102981>
- Ajayi, A. M., Ayodele, E. O., Ben-Azu, B., Aderibigbe, A. O., & Umukoro, S. (2019). Evaluation of neurotoxicity and hepatotoxicity effects of acute and sub-acute oral administration of unripe ackee (*Blighia sapida*) fruit extract. *Toxicology Reports*, *6*(July), 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.019>
- Akinpelu, O. E., Moronkola, D. O., Dawodu, F. A., & Sichilongo, K. (2017). Chemical compositions of seven essential oils from *Blighia sapida* (K. Koenig), (Sapindaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *10*(5), 2351. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i5.32>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*(March), 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Alim, A., Li, T., Nisar, T., Ren, D., Zhai, X., Pang, Y., & Yang, X. (2019). Antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activity- based comparative study of peel and flesh polyphenols from *Actinidia chinensis*. *Food and Nutrition Research*, *63*(3), 1–10. <https://doi.org/10.29219/fnr.v63.1577>
- Aloko, S., Azubuike, C. P., & Coker, H. A. B. (2017). Physicochemical properties and lubricant potentials of blighia sapida sapindaceaeae seed oil in solid dosage formulations. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *16*(2), 305–311. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i2.7>
- Álvarez, A., Fernández, L., Gutiérrez, D., Iglesias, B., Rodríguez, A., & García, P. (2019). Methicillin-resistant staphylococcus aureus in hospitals: Latest trends and treatments based on bacteriophages. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.01006-19>
- Anzolin, A. P., Bertol, C. D., Taparello, G. C., da Silveira, V. C., do Nascimento, P., & Rossato-Grando, L. G. (2022). Influence of processing methods on the content of polyphenols and anthocyanins and on the antioxidant activity of *Rubus brasiliensis* Mart. fruits. *Brazilian Journal of Food Technology*, *25*, 1–7. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20720>
- Aravena, C., Cáceres, J., A, A. B., Opazo, J. F., Magna, Y., Saralegui, C., Quintana, C., & Campo, D. (2021). Portación nasal, antibiotipo y genotipo de cepas de. *Rev Chilena Infectol*, *38*(6), 774–782.
- Arias, D., Montaña, L., Velasco, M., & Martínez, J. (2018). Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. *Tecnura*, *22*(57), 55–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.14483/22487638.12178>

- Armand Kouassi Kakpo, Jacques Ahouassa, Majella Chrysante Djohossou, Stanislas Djossou, Carolle Abiola Adjalla, Claudia Aurelie Fagla, Armel Thomas Elegbede, & Moutawakilou Gomina. (2020). Intoxication of the immature fruit of the ackee (*Blighia sapida* Koenig): Summary and development. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 067–077. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.13.1.0314>
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298–7303. <https://doi.org/10.1021/jf9016652>
- Barreca, D., Trombetta, D., Smeriglio, A., Mandalari, G., Romeo, O., Felice, M. R., Gattuso, G., & Nabavi, S. M. (2021). Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. *Trends in Food Science and Technology*, 117(March), 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.030>
- Benkeblia, N. (2014). Respiration rate, ethylene production and biochemical variations of ackee fruit arils (*Blighia sapida* Koenig) stored under three temperature regimes. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.06.003>
- Blainski, A., Lopes, G., & De Mello, J. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Bonten, M., Johnson, J. R., Van Den Biggelaar, A. H. J., Georgalis, L., Geurtsen, J., De Palacios, P. I., Gravenstein, S., Verstraeten, T., Hermans, P., & Poolman, J. T. (2021). Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*, 72(7), 1211–1219. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210>
- Botelho, J., & Schulenburg, H. (2021). The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. *Trends in Microbiology*, 29(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.011>
- Brescia, P. (2012). *Determination of antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay with Synergy™ H4*.
- Brignone, S. G. (2020). Efectos biológicos de la Vitamina C y su implicancia en el diseño de formulaciones tópicas : Biological effects of Vitamin C and its implication in the design of topical formulations. *RESCIFAR Revista Española de Ciencias Farmacéuticas*, 1(2), 169–182.
- Cano P., C., Bonilla R., P., & Valdivieso I., R. (2020). Metabolitos secundarios y capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Ciencia e Investigación*, 23(1), 15–18. <https://doi.org/10.15381/ci.v23i1.18718>
- Carretero, A. (2022). Economía circular versus economía lineal . Propuestas normativas en España y Francia relativas al uso de envases y a la información. *Revista CESCO*, 42, 19–52. https://doi.org/doi.org/10.18239/RCDC_2022.42.3064
- Carvajal, C. C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Castillo Mendoza, B. E., Cajas Palacios, M. P., Montoya Vizuete, S. N., & Garcia Larreta, F. S. (2022). Actividad Antioxidante, Polifenoles Totales y Tamizaje Fitoquímico de Chilangua (*Eryngium Foetidum*). *RECIAMUC*, 6(3), 480–489. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.480-489](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.480-489)
- Castro Acosta, M. L. (2019). Polifenoles: Compuestos bioactivos con efectos benéficos en la prevención de diabetes tipo 2. *REDCieN*, 1(3), 13–18.

- Chaves, V. C., Boff, L., Vizzotto, M., Calvete, E., Reginatto, F. H., & Simões, C. M. O. (2018). Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4331–4338. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8959>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Cortez, J., Faicán, M., Pirovani, M., & Piagentini, A. (2018). Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada : Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(2).
- Cuellar, F. A., Ariza, E., Anzola, C., & Restrepo, P. (2013). Research of antioxidant capacity of araza (*Eugenia stipitata* mc vaugh) during the ripening. *Revista Colombiana de Química*, 42(2), 213–325.
- Cui, Q., Du, R., Liu, M., & Rong, L. (2020). Lignans and their derivatives from plants as antivirals. *Molecules*, 25(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25010183>
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564–578. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>
- Darniadi, S., Ifie, I., Ho, P., & Murray, B. S. (2019). Evaluation of total monomeric anthocyanin, total phenolic content and individual anthocyanins of foam-mat freeze-dried and spray-dried blueberry powder. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1599–1606. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00076-w>
- Das, A. K., Islam, M. N., Faruk, M. O., Ashaduzzaman, M., & Dungani, R. (2020). Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>
- De Angelis, G., Fiori, B., Menchinelli, G., D’Inzeo, T., Liotti, F. M., Morandotti, G. A., Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Spanu, T. (2018). Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007–2015). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(9), 1627–1636. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3292-9>
- De la Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E., & García-Fajardo, J. A. (2019). Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1–13. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.179>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Djenontin, S., Wotto, V., Lozano, P., Pioch, D., & Sohounhloúé, D. (2009). Characterisation of *Blighia sapida* (Sapindaceae) seed oil and defatted cake from Benin. *Natural Product Research*, 23(6), 549–560. <https://doi.org/10.1080/14786410802133886>
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, Ph., Woillez, M., & Mérillon, J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768–1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>

- Durazzo, A., & Lucarini, M. (2019). Editorial: The State of Science and Innovation of Bioactive Research and Applications, Health, and Diseases. *Frontiers in Nutrition*, 174(11), 1177–1194. <https://doi.org/2019.00178>
- E. Acosta-Otálvaro, J.C. Mazo-Rivas, C. G.-V. (2020). Predicción del contenido de polifenoles totales de extractos de cacao , a partir del espacio de color CIElab. *Agri-Food*, 829(July), 15–18.
- El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T., & Krisa, S. (2018). A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1007–1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>
- Emanuel, M., Gutierrez-Orozco, F., Yahia, E., & Benkeblia, N. (2013). Assessment and profiling of the fatty acids in two ackee fruit (*Blighia sapida* Köenig) varieties during different ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 722–726. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5946>
- Encalada Añazco, R. F., Peñaherrera Vásquez, D. L., & González Illescas, M. L. (2021). Los superalimentos como tendencia del mercado: Un análisis de las oportunidades para las empresas exportadoras. *INNOVA Research Journal*, 6(2), 157–179. <https://doi.org/10.33890/innova.v6.n2.2021.1627>
- Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*, 49–70. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76719>
- Espósito, B., Sessa, M. R., Sica, D., & Malandrino, O. (2020). Towards circular economy in the agri-food sector. A systematic literature review. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/SU12187401>
- Fernanda Meléndez-Sosa, M., Montserrat García-Barrales, A., Andrea, N., & Licenciatura En Biotecnología, V.-G. (2020). Perspectives and Impact on Health From Functional Food and Nutraceutical Consumption in Mexico. *Revista RD*, 6(1), 114–136.
- Fernández, R., & Lizana, X. C. (2020). Antocianinas en *Solanum tuberosum*: Una revisión. *Agro Sur*, 48(2), 1–8. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2020.v48n2-01>
- Feßler, A. T., Scholtzek, A. D., Schug, A. R., Kohn, B., Weingart, C., Hanke, D., Schink, A. K., Bethe, A., Lübke-Becker, A., & Schwarz, S. (2022). Antimicrobial and Biocide Resistance among Canine and Feline *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Isolates from Diagnostic Submissions. *Antibiotics*, 11(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020152>
- Forbes-Hernández, T. Y., Betancourt, G., Rodríguez, D., & García, M. A. (2020). Capacidad antioxidante total de la dieta vs. balance redox. *Revista de Ciencias de La Salud ISSN: 2588-0608*, 4(1), 35. <https://doi.org/10.33936/qkrcs.v4i1.2711>
- Fraire-Reyes, I. A., Gaitán-Fonseca, C., Cepeda-Argüelles, Ó., Esparza-Villalpando, V., Aguilera-Galaviz, L., & Bermúdez-Jiménez, C. (2022). Use and Effectiveness of Propolis on Chronic Periodontitis: a Systematic Review. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 24(1), 32–43. <https://doi.org/10.15517/IJDS.2022.48547>
- Fuentes-Barría, H., Peña, D., Aguilera, R., & González, C. (2018). Influencia de los compuestos bioactivos de betarraga (*Beta vulgaris* L) sobre el efecto cardio-protector: Una revisión narrativa. *Rev Chil Nutr*, 45(2), 178–179. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182018000300178>.

- Furusawa, C., Horinouchi, T., & Maeda, T. (2018). Toward prediction and control of antibiotic-resistance evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 54, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.026>
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2020). A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25245986>
- Garabiza, B., Prudente, E., & Quinde, K. (2021). La aplicación del modelo de economía circular en Ecuador: Estudio de caso. *Espacios*, 42(02), 222–237. <https://doi.org/10.48082/espacios-a21v42n02p17>
- García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Gomes, C. F., Gomes, J. H., & da Silva, E. F. (2020). Bacteriostatic and bactericidal clays: an overview. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(11), 3507–3527. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00628-w>
- Gómez Chávez, L. F. J., Cortés Almanzar, P., Rodríguez Melchor, V. Z. del C., Salazar Pérez, J. I., & Gómez Chávez, M. Y. (2022). Actividad física y cáncer: una revisión bibliométrica 2016-2021 (Physical activity and cancer: a bibliographic review 2016-2021). *Retos*, 45, 622–627. <https://doi.org/10.47197/retos.v45i0.92728>
- González, G. C., & Pomar Fernández, S. (2021). La economía circular en los nuevos modelos de negocio. *Entreciencias: Diálogos En La Sociedad Del Conocimiento*, 9(23). <https://doi.org/10.22201/enesl.20078064e.2021.23.79933>
- Guevara Díaz, J. A. (2021). *Resistencia bacteriana: organismos del grupo Eskape Artículos Estudiantiles View project Educación Médica View project*. <https://www.researchgate.net/publication/357355210>
- Gutiérrez-Venegas, G. (2018). Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes geriátricos. *Efectos Beneficiosos De Los Flavonoides*, 56, 1–2.
- Hernando-Requejo, O., & García de Quinto, H. (2021). Nutrición Hospitalaria Dieta mediterránea y cáncer Mediterranean diet and cancer Correspondencia. *Nutricion Hospitalaria*, 38, 0–3. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20960/nh.3803>
- Hurtado, N. H., & Charfuelan, C. (2019). Contribución a la Caracterización y Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Antocianinas del Fruto de Ivilan (Monnina Obtusifolia H.B.K.). *Información Tecnológica*, 30(5), 81–90. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000500081>
- Iwatani, S., & Yamamoto, N. (2019). Functional food products in Japan: A review. *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.011>
- Jiménez-Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J., Duarte Valderrama, C., Salgado-Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43, 1. <https://doi.org/doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- John, R. (2021). Functional Foods: Components, health benefits, challenges, and major projects. *DRC Sustainable Future: Journal of Environment, Agriculture, and Energy*, 2(June), 61–72. <https://doi.org/10.37281/drcsf/2.1.7>
- Juan Horna-Reátegui, T., Rocío, M., Llaque-Sánchez, D. P., & Hurtado-Escamilo, S. T. (2020). Efecto antifúngico de la óleo-resina de *Copaifera paupera* comparada con fluconazol sobre *Candida albicans*: un estudio in vitro. <https://orcid.org/0000-0002-5185-5047>

- Kim, K., Kim, Y., & Lee, K. (2018). Categorization of fruits according to their content of polyphenols and vitamin C, antiradical activity, and quality parameters. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), 1–6. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13421>
- Kořton, A., Długosz-Grochowska, O., Wojciechowska, R., & Czaja, M. (2022). Biosynthesis Regulation of Foliates and Phenols in Plants. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 291). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110561>
- Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., & Kašparovský, T. (2019). Isoflavones. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>
- Kumar, G., & Baojun, X. (2017). A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients*, May. <https://doi.org/10.3390/nu9050455>
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). Acinetobacter baumannii antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*, 10(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- la Quintana, R. M. de, & Paucar-Menacho, L. M. (2020). Lucuma (Pouteria lucuma): Composition, bioactive components, antioxidant activity, uses and beneficial properties for health. *Scientia Agropecuaria*, 11(1), 135–142. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.01.15>
- Latorre-Barragan, M. F., Zurita-Leal, A. C., & Gudiño Gomezjurado, M. E. (2019). Resistencia de los antibióticos β -lactámicos en países latinoamericanos. *Medwave*, 19(10), e7729. <https://doi.org/10.5867/medwave.2019.10.7729>
- Lisset, M., Regal, L., Morales, R. C., Rivero Morey, R. J., Rivero Morey, J., García Pérez, D. L., & Bordón González, L. (2018). La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. *Medisur*, 16(5), 699–710.
- López, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- López-Palestina, C., Aguirre-Mancilla, C., Ramírez-Pimentel, J., Raya-Pérez, J., Santiago-Saenz, Y., Gutiérrez-Tlahque, Y., & Hernández-Fuentes, A. (2019). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante en tres estados de madurez de Myrtillocactus geometrizans provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Vol. 4(2019), 317–322.
- Lozano-Picazo, C. M., & Fernández-Belda, F. (2020). Especies reactivas de oxígeno y su implicación en Biomedicina. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 34(2018), 17–26. <https://doi.org/10.6018/analesvet.332621>
- Mallco, D. J. Z., & Rivera, P. E. B. (2020). Propuesta de compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico de hojas de Clinopodium pulchellum (kunth) govaerts « panisara » Characterization of phenolic compounds of the metallolic extract of leaves of clinopodium pulchellum (kunth) govaert. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 5(4), 135–139.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Maqsood, S., Adiamo, O., Ahmad, M., & Mudgil, P. (2020). Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. *Food Chemistry*, 308, 125522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125522>
- Martín, D. (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>

- Martins, G. R., Monteiro, A. F., do Amaral, F. R. L., & da Silva, A. S. (2021). A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. *Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 4693–4702. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04959-5>
- Mendoza Isaza, N. A., Hoyos-Arbeláez, J. A., & Peláez-Jaramillo, C. A. (2020). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de Stevia rebaudiana en varios modelos in vitro. *Revista EIA*, 17(34), 1–9. <https://doi.org/10.24050/reia.v17i34.1282>
- Mesén-Mora, L. D., Carvajal-Miranda, Y., Álvarez-Valverde, V., & Rodríguez-Rodríguez, G. (2019). Bioprospecting study, antibiotic and antioxidant activity of the santol's fruit (*Sandoricum koetjape*). *Uniciencia*, 33(1), 75–82. <https://doi.org/10.15359/ru.33-1.6>
- Mex-Álvarez, R., Garma-Quen, P., Blanco-Tapia, P., Robaldino-Pool, D., Campos-Marques, A., & Acal-Interián, D. (2019). Actividad Antioxidante de *Ixora coccinea*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 6(3), 2–9.
- Mitchell, S., Webster, S., & Ahmad, M. (2008). Ackee (*Bighia sapida*) – Jamaica's top fruit. *Biotechnology Centre, University of the West Indies, May*, 1–19.
- Mora Agüero, S. D. los Á., Zeledón Aguilera, A. S., & Vargas Rubio, T. (2019). Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista Medica Sinergia*, 4(5), 89–100. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i5.211>
- Moya, A., Hoba, F., Digbeu, Y., Binaté, S., Kouamé, L., & Dué, E. (2018). Physical Characteristics of The Fruit and Nutritional Potentialities of Dried and Roasted Seeds Arils of *Blighia Sapida* (Ackee Apple). *International Journal of Trend in Research and Development*, 5(2).
- Mrduljaš, N., Krešić, G., & Bilušić, T. (2017). Polyphenols: Food Sources and Health Benefits. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68862>
- Muzolf-panek, M. (2022). Relationship between Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Color Parameters of Red Table Grape Skins Using Linear Ordering Analysis. *Applied Sciences*.
- Ogunmakinde, O. E. (2019). A review of circular economy development models in China, Germany and Japan. *Recycling*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/recycling4030027>
- Olapade, A. A., State, O., Polytechnic, T. O., & State, O. (2019). Evaluation of Boiled and Soaked Akee Apple (*Blighia Sapida*) Aril. *Applied Tropical Agriculture*, 24(1), 36–41.
- Olivas Orozco, G. I., Lamz Piedra, A., Cázares Chávez, Z., Jiménez Galindo, J. C., Molina-Corral, J., Sepúlveda, D., & Rios-Velazco, C. (2021). Cocción tradicional con especias de *Phaseolus vulgaris* L. y su efecto antinutricional e inhibición bacteriana. *Biocencia*, 23(1), 62–69. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v23i1.1327>
- Oloyede, O., Ajiboye, T., Abdussalam, A., & Adeleye, A. (2014). *Blighia sapida* leaves halt elevated blood glucose, dyslipidemia and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 157(November 2014), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.022>
- Onuekwusi, E., Akanya, H., & Evans, E. (2014). Phytochemical Constituents of Seeds of Ripe and Unripe *Blighia Sapida* (K. Koenig) and Physicochemical Properties of the Seed Oil. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 3(9), 31–40.
- Ordoñez. (2020). *Actividad antifúngica y antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Usnea laevis frente a Candida albicans, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.20453/rmh.v3li3.3806>
- Ordoñez, E. S., Leon-Arevalo, A., Rivera-Rojas, H., & Vargas, E. (2019). Quantification of total polyphenols and antioxidant capacity in skins and seeds from cacao (*Theobroma cacao* L.),

- tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), grape (*Vitis Vinífera*) and uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 175–183. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.02>
- Ordoñez-Gómez, E. S., Reátegui-Díaz, D., & Villanueva-Tiburcio, J. E. (2018). Total polyphenols and antioxidant capacity of peel and leaves in twelve citrus. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 123–131. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.13>
- Origbemiso, B. A., & Ifesan, B. O. (2021). Nutritional, phytochemical, glycaemic index, antihyperglycaemic properties and quality attribute of Wheat-ackee arils cookies for diabetic patients. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 144–154. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00623-w>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Parcheta, M., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Akimowicz, M., Choińska, R., & Lewandowski, W. (2021). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials*, 14(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ma14081984>
- Paun, N., Botoran, O. R., & Niculescu, V. C. (2022). Total Phenolic, Anthocyanins HPLC-DAD-MS Determination and Antioxidant Capacity in Black Grape Skins and Blackberries: A Comparative Study. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/app12020936>
- Phuong, N. N. M., Le, T. T., Dang, M. Q., Van Camp, J., & Raes, K. (2020). Selection of extraction conditions of phenolic compounds from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel. *Food and Bioproducts Processing*, 122, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.008>
- Karak, P. (2019). BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS: AN OVERVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567–1574.
- Quesada-Rojas, P., & Barrantes-Santamaría, W. (2019). In situ characterization of the ackee (*Blighia sapida*) and its commercial potential in Costa Rica. *Agronomy Mesoamerican*, 30(3), 885–898. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.34701>
- Rahman, S., Mathew, S., Nair, P., Ramadan, W. S., & Vazhappilly, C. G. (2021). Health benefits of cyanidin-3-glucoside as a potent modulator of Nrf2-mediated oxidative stress. *Inflammopharmacology*, 29(4), 907–923. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00799-7>
- Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136(April), 109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
- Reyes, D., Ortega, D., Quintero, J., Piquer, S., Alarcón, M., & Silva, R. F. Da. (2017). Efecto antimicrobiano del extracto foliar de mango (*Mangifera indica* L. cv. Bocado) en microorganismos de interés clínico. (Spanish). *Antimicrobial Effect of Mango Leaf Extract (Mangifera Indica L. Cv. Bocado) on Microorganisms of Clinical Interest. (English)*, 21(2), 7.
- Reyes Pillajo, I. Y., Villacres, C. E., Santacruz Terán, S. G., Castro García, M. R., Chávez Campuzano, M. F., & Armas Vega, A. D. C. (2019). Efecto antibacteriano y antioxidante de frutos rojos ecuatorianos sobre streptococcus mutans: estudio in vitro. In *Odontología vital* (Vol. 2, Issue 31, pp. 23–30).
- Ridaura, G. (2020). La Economía circular en Ecuador: perspectivas de cumplimiento de los ODS en la era Post COVID-19. *CienciAmérica*, 9(4), 19. <https://doi.org/10.33210/ca.v9i4.339>
- Ríos-Muñoz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., & Estrada-García, T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogénesis y

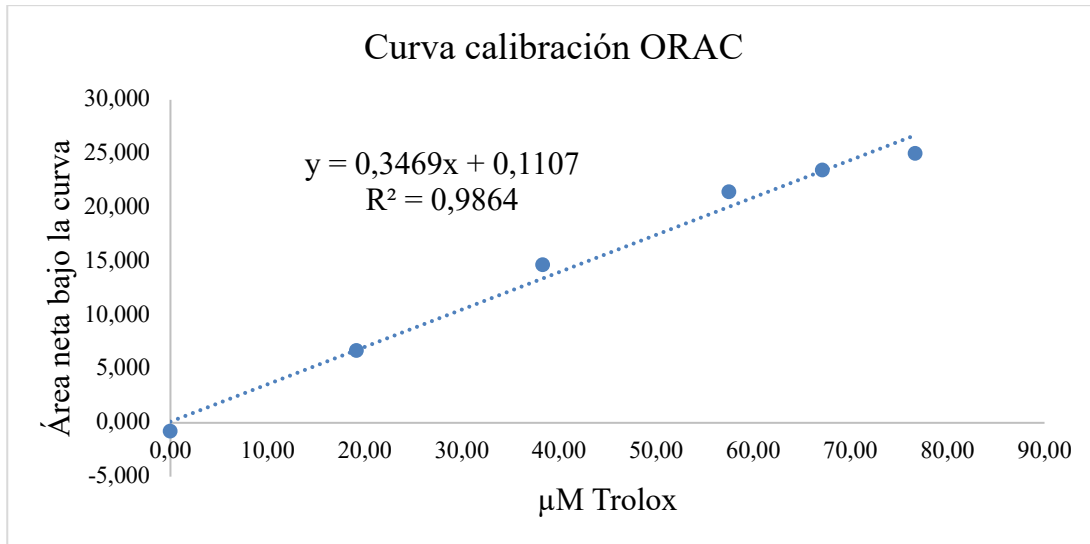
- modelos múridos. *Gaceta Medica de Mexico*, 155(4), 410–416. <https://doi.org/10.24875/GMM.19004716>
- Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, 1–30. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Rojano, B., Zapata, I. C., & Farid Bernardo Cortes, C. (2012). Anthocyanin stability and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of corozo aqueous extracts (*Bactris guineensis*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3), 244–255.
- Rojas-Garbanzo, C., Gleichenhagen, M., Heller, A., Esquivel, P., Schulze-Kaysers, N., & Schieber, A. (2017). Carotenoid Profile, Antioxidant Capacity, and Chromoplasts of Pink Guava (*Psidium guajava* L. Cv. 'Criolla') during Fruit Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3737–3747. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04560>
- Sabee, M. M. S. M., Awang, M. S., Bustami, Y., & Hamid, Z. A. A. (2020). Gentamicin loaded PLA microspheres susceptibility against staphylococcus aureus and escherichia coli by kirby-bauer and micro-dilution methods. *AIP Conference Proceedings*, 2267, 8. <https://doi.org/10.1063/5.0017438>
- Sánchez, J., Benavides, J., Heredia, J., Cisneros, L., & Jacobo, D. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Sánchez, P., Elena, R., & C, Á. V. T. (2019). Physicochemical properties of wild *Rubus* fruits with nutraceutical and nutritional potential. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 23, 291–301.
- Sánchez Vega, M. V. (2022). Caracterización de la planta que produce los frutos conocidos como seso vegetal o ackee *Blighia sapida* (Sapindaceae). *Biocenosis*, 33(2), 29–34. <https://doi.org/10.22458/rb.v33i2.4539>
- Sander, J., Terhardt, M., & Janzen, N. (2020). Study on the Metabolic Effects of Repeated Consumption of Canned Ackee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(49), 14603–14609. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06235>
- Schettert Kerschner, K., Batu de Souza, E., & Kessler Nunes Deuschle, V. C. (2021). Estabilidade E Fotoproteção De Formulações Contendo Extrato De Punica Granatum E Metoxinamato De Octila. *Revista Contexto & Saúde*, 21(44), 68–80. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2021.44.12000>
- Scicutella, F., Mannelli, F., Daghigho, M., Viti, C., & Buccioni, A. (2021). Polyphenols and organic acids as alternatives to antimicrobials in poultry rearing: A review. *Antibiotics*, 10(8), 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081010>
- Serra Bisbal, J. J., Melero Lloret, J., Martínez Lozano, G., & Fagoaga, C. (2020). Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.*, 12, 71–90. https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.577
- Shoib, S., Rahman, S., Rupasinghe, V., & Vazhappilly, C. (2020). Dietary Flavonoids in p53—Mediated Immune Dysfunctions Linking to Cancer Prevention. *Biomedicines*, 8, 286.
- Sinmisola, A., Oluwasesan, B. M., & Chukwuemeka, A. P. (2019). *Blighia sapida* K.D. Koenig: A review on its phytochemistry, pharmacological and nutritional properties. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 235, pp. 446–459). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.017>
- Soto-Madrid, D., Gutiérrez-Cutiño, M., Pozo-Martínez, J., Zúñiga-López, M. C., Olea-Azar, C., & Matiacevich, S. (2021). Dependence of the ripeness stage on the antioxidant and antimicrobial

- properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts from industrial by-products. *Molecules*, 26(10), 15. <https://doi.org/10.3390/molecules26102878>
- Srivastava, S., Kumar, P., & Kumara, S. (2018). Nutraceuticals : A Review. *Dermatology and Therapy*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13555-018-0221-x>
- Stella, L., Aristizabal, R., & Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia Et Technica*, XVII(50), 152–157.
- Suárez-Espinoza, K. (2022). Avances y desafíos en la promoción y gestión público institucional de los residuos agropecuarios en Costa Rica. *Política Económica Para El Desarrollo Sostenible*, 7(2), 1–19. <https://doi.org/10.15359/peds.7-2.3>
- Sybron, A., Rai, D. K., Vaidya, K. R., Hossain, M. B., & Benkeblia, N. (2019). Effects of ripening stage on the content and antioxidant capacities of phenolic compounds of arils, seeds and husks of ackee fruit *Blighia sapida* Koenig. *Scientia Horticulturae*, 256, 8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108632>
- Syed-León, R., Orozco, R., Álvarez, V., Carvajal, Y., & Rodríguez, G. (2020). Chemical and Antioxidant Characterization of Native Corn Germplasm from Two Regions of Costa Rica: A Conservation Approach. *International Journal of Food Science*, 2020, 9. <https://doi.org/10.1155/2020/2439541>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). Pseudomonas aeruginosa biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tsuru, V. H., Gomes, R. J., Silva, J. R., Prudencio, S. H., Costa, G. N., & Spinoza, W. A. (2021). Physicochemical, antioxidant and sensory properties of Kombucha beverages obtained from oolong or yerba mate tea fermentation. *Research, Society and Development*, 10(11), e62101118790. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.18790>
- Us-Medina, U., Millán-Linares, M. D. C., Arana-Argaes, V. E., & Segura-Campos, M. R. (2020). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of chaya extracts (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). *Nutricion Hospitalaria*, 37(1), 46–55. <https://doi.org/10.20960/nh.02752>
- Valladares, A., Loera, I., & León, F. (2018). Identificación de genes atioxidantes a partir de semilla de Moringa (*Moringa oleifera*). *Jovenes En La Ciencia*, 4(1), 28–32.
- Vandebroek, I., & Voeks, R. (2018). The Gradual Loss of African Indigenous Vegetables in Tropical America: A Review. *Economic Botany*, 72(4), 543–571. <https://doi.org/10.1007/s12231-019-09446-3>
- Vila, D. R. (2020). Nutrición Hospitalaria. *Nutrición Hospitalaria*, 37, (3) 43-46. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20960/nh.03356>
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of klebsiella pneumoniae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Whiteway, C., Breine, A., Philippe, C., & Van der Henst, C. (2022). Acinetobacter baumannii. *Trends in Microbiology*, 30(2), 199–200. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.11.008>
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of Klebsiella pneumoniae. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Yang, L., Wen, K., & Ruan, X. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 23(4), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zamora, I., & Barbosa, Y. (2020). Consumo de alimentos funcionales por estudiantes universitarios Ecuatorianos. *Food Science and Human Wellness*, 9(3), 272–279.

- Zapata, S. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 16(1), 25–36.
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2021). Effect of phenolic acids on the antioxidant system of tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agronomy Mesoamerican*, 32(3), 854–868. <https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.45101>
- Zenia, G., Antonio, M. A., & Caridad, R. D. De. (2022). Comparación de las propiedades antioxidantes del *Pleurotus ostreatus* antes y después de tratamientos térmicos Comparison of the antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* before and after thermal treatments Paneque-Díaz Yurisdan proteínas y bajo conten. *Revista Científica Arbitrada de Investigación En Comunicación, Marketing y Empresa REICOMUNICAR*, 5, 221–232. <https://doi.org/doi.org/10.46296/rc.v5i9.0045>
- Zevallos, D. R. R. (2018). Estudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert. *Rev Soc Quím Perú*, 84(2). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2018000200002&script=sci_arttext

8. Anexos

Anexo 1. Ejemplo de una de las curvas de calibración usadas para cuantificar la actividad antioxidante por el método ORAC



Anexo 2. Efecto antibiótico del control positivo sobre las bacterias ESKAPE.

*Control positivo	Pocillo 1 (mm)	Pocillo 2 (mm)	Pocillo 3 (mm)	PROM
<i>Escherichia coli</i>	17,00	16,00	15,00	16,00
<i>Staphilococcus aureus</i>	18,00	18,00	17,00	17,67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13,00	13,00	13,00	13,00
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,00	13,00	13,00	13,00
<i>Enterococcus faecium</i>	13,00	13,00	13,00	13,00

Nota. *El control positivo es el antibiótico comercial Penicilina Estreptomina de Gibco. A una concentración de 1000 µg/mL. *A. baumannii* no fue susceptible a los antibióticos.

Anexo 3. Ackee recolectado en la zona caribeña de Costa Rica en distintas etapas de maduración.



Anexo 4. Extracciones de las distintas partes del Ackee listas en balones aforados para luego ser sometidas al método de Folin–Ciocálteu.

