

# Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica

## Preliminar study on polyphenolic contents and antioxidant capacity of *Malus domestica* cultivated in Costa Rica

Mirtha Navarro-Hoyos<sup>1\*</sup>, Ileana Moreira-González<sup>2</sup>, Elizabeth Arnáez-Serrano<sup>2</sup>, Renato Murillo-Masís<sup>1</sup>, William Rivera-Méndez<sup>2</sup>, William Zamora-Ramírez<sup>1</sup>, Ana Yury Saravia-Arguedas<sup>3</sup>, Felipe Vargas-Huertas<sup>1</sup>

---

Fecha de recepción: 28 de abril de 2016  
Fecha de aprobación: 30 de setiembre de 2016

Navarro-Hoyos, M; Moreira-González, I; Arnáez-Serrano, E; Murillo-Masís, R; Rivera-Méndez, W; Zamora-Ramírez, W; Saravia-Arguedas, A; Vargas-Huertas, F. Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 30-1. Enero-Marzo 2017. Pág 3-13.

DOI: 10.18845/tm.v30i1.3060



1 Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica  
2 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica  
3 Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica  
\* Correspondencia debe ser dirigida a: mnavarro@codeti.org

## Palabras clave

*Malus domestica*; manzana; capacidad antioxidante; polifenoles; microorganismos; flavonoides; ácidos fenólicos; flavan-3-oles.

## Resumen

Especies como la manzana de altura han sido sometidas en Costa Rica a un proceso de domesticación para adaptarlas a las condiciones climáticas de ese país y específicamente a las de la Zona de los Santos de Costa Rica. Este esfuerzo ha llevado a la obtención en la actualidad de productos que son bien aceptados en el mercado por su sabor, olor, facilidad de manipulación, entre otros. Con el avance del conocimiento biológico y químico, los estudios del contenido de polifenoles en este tipo de frutos se han incrementado, demostrando que estos poseen propiedades bioactivas, tal como su potencial antioxidante, siendo este conocimiento un factor importante en la creciente utilización de frutas y suplementos nutricionales con contenido polifenólico importante a nivel internacional y en la dieta de los costarricenses. De allí, que el presente trabajo se enfoca en realizar estudios en frutos de altura cultivados en Costa Rica, tanto desde el punto de vista de mejora agroecológica, así como de la determinación del contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante. Se adquirieron frutos de dos variedades de la especie *Malus domestica*, a saber, manzana variedad Ana y Jonas, que fueron procesados en el laboratorio con el fin de ser utilizados para estas determinaciones. Además, se trabajó en la mejora de las condiciones agroecológicas para el cultivo con el uso de microorganismos de biocontrol contribuyendo a la protección de suelo. Esta publicación presenta información preliminar de estos estudios, dada su relevancia para el conocimiento científico con resultados que se publican por primera vez para esta especie económicamente importante cultivada en Costa Rica.

## Keywords

*Malus domestica*; apple; polyphenols; antioxidant capacity; microorganisms; flavonoids; phenolic acids; flavan-3-ols.

## Abstract

Species such as high altitude fruits, such as *Malus domestica* have been introduced in Costa Rica and adapted to its climatic conditions, being cultivated specifically in Los Santos region. These efforts have allowed to obtain fruits that are well accepted in the market because of their flavor, aroma and easiness of handling. On the other hand, the advancement of biologic and chemical techniques have enabled more detailed research on polyphenols –abundant in these fruits- because of their bioactive properties such as antioxidant potential. This scientific knowledge has in turn been an important factor in a higher consumption of fruits with high polyphenolic contents both fresh and in nutritional supplements. Hence, the present work focuses in the study of these high altitude fruits cultivated in Costa Rica, regarding agro-ecologic improvement as well as determination of polyphenolic contents and antioxidant capacity. Two cultivars of *Malus domestica* were acquired, namely Ana and Jonas, which were processed to carry out analyses. Also, work was performed in agro-ecologic conditions amelioration and biocontrol for soil protection. This publication includes preliminary data because of the relevance of the scientific results published for the first time for this economic important species cultivated in Costa Rica.

## Introducción

Los estudios interdisciplinarios que permiten determinar las condiciones agroecológicas óptimas para el cultivo de especies, así como el contenido de los compuestos activos polifenólicos y de su bioactividad, tal como la antioxidante, son la premisa de donde parte este estudio sobre la especie *Malus domestica*, que pertenece a la familia Rosaceae y fue introducida en Costa Rica por productores de la zona de Los Santos, pertenecientes a la cooperativa FRUTALCOOP.

La comercialización de esta fruta se ha visto afectada por la carencia de posicionamiento en el mercado [1] debido a la competencia de productos importados. La conservación de germoplasma es de gran importancia cuando se caracteriza fitoquímicamente una especie o variedad, ya que la actividad agrícola que propicia cultivos mejorados productos de la selección, ha sufrido disminución de su base genética lo cual incrementa su vulnerabilidad a enfermedades e insectos propiciando así la erosión genética [2]. De ahí que los aspectos botánicos deben ser contemplados en cualquier investigación que propicie la conservación de germoplasma.

En efecto, los polifenoles han sido reconocidos como importantes principios activos, desde las primeras referencias a la “paradoja francesa” [3], en que numerosos estudios han mostrado el potencial saludable de estos compuestos, por ejemplo en relación a actividad antiinflamatoria, anticancerígena, neuroprotectora [4] [5] y antimicrobiana [6], [7], donde los flavan-3-oles y sus polímeros, las proantocianidinas, son potentes protectores del organismo contra especies reactivas de oxígeno [8], utilizándose como ingredientes funcionales en suplementos nutricionales [9].

Un estudio reciente realizado sobre el contenido polifenólico de especies costarricenses [10] ha mostrado diversidad en contenido de proantocianidinas, con unidades de catequina y epicatequina, así como propelargonidinas, con unidades de afzelequina y epiafzelequina, incluyendo dímeros, trímeros y oligómeros de hasta once unidades monoméricas; flavalignanos y ácidos fenólicos.

Estudios exploratorios han mostrado que la manzana posee un alto contenido de flavonoides, compuestos que previenen el estrés oxidativo y que poseen propiedades antiinflamatorias y antitumorales [11]; [12]. Por otro lado [13] ha descrito que los polifenoles extraídos de frutas inmaduras de manzana poseen actividades antialérgicas en ensayos in vitro.

En cuanto a compuestos fenólicos obtenidos en *Malus domestica*, incluyendo hojas [14] y frutos [15], se han reportado ácidos coumaroil quínicos [16], rutina y fenilpropanoides [17]; glicósidos de quercetina y ramnetina, procianidina B2 y floridzina [18]. Por otro lado, se ha reportado capacidad antioxidante [19]; [20]; [11] en frutos de manzana, correlacionada con el contenido fenólico; habiéndose descrito asimismo propiedades antiinflamatorias, demostrando que un extracto condensado de taninos preparado a partir de manzanas, inhibe la liberación de histamina en línea celular murina de leucemia RBL-2H3 [13].

En el presente estudio se presentan resultados preliminares del trabajo agroecológico y de biocontrol para protección del suelo, así como de la caracterización de los compuestos polifenólicos de cáscara y pulpa de la especie y la valoración del potencial antioxidante de los extractos obtenidos de los frutos de manzana (*Malus domestica*) de tres diferentes muestras compuestas de dos variedades, Ana y Jonas, cultivadas en la zona de Los Santos.

## Materiales y Métodos

El trabajo se llevó a cabo de agosto 2014 a marzo 2016, con la especie *Malus domestica* cultivada por productores de la cooperativa FRUTALCOOP en Copey de Dota, en la zona de Los Santos, San José.

### Componente 1. Manejo agro-ecológico y biocontrol

Se localizaron junto con los productores de la zona de Copey de Dota y San Marcos de Tarrazú los árboles de las variedades de manzana (*Malus* sp) Jonas y Ana más productivos. Se georreferenciaron y se colectó una muestra de la primera variedad y dos muestras de la segunda, correspondiendo a la variedad más comercializada en el país. Cada una de estas muestras se depositó en el Herbario del Museo Nacional de Costa Rica, con su respectiva descripción botánica.

Se hizo un muestreo de suelos para determinar la composición física y química de los mismos, usando el método de cuarteo de muestras compuestas de 20 sitios donde están estos cultivos. Por otro lado, se hizo un análisis de la biodiversidad de microorganismos presentes en los cultivos, para lo cual se obtuvieron muestras de los árboles de manzana (tallo, ramas y hojas) y de algunos insectos (*Phyllophaga* sp) asociados al sistema radical. Las mismas fueron trasladadas al laboratorio del CIB (Centro de Investigaciones en Biotecnología del ITCR) para la búsqueda de microorganismos antagonistas o entomopatógenos propios del lugar. Se utilizaron medios enriquecidos para los procesos de aislamiento de algunos organismos deseables. Las cepas fueron identificadas y se conservan en el laboratorio. Se ofreció a los productores un curso-taller sobre Biofábricas en la zona donde se realizó este estudio.

### Componente 2. Contenido polifenólico y actividad antioxidante

Se adquirieron 5 Kg de frutos frescos -listos para su comercialización- de *Malus domestica* de la variedad Jonas así como de la variedad Ana, en este último caso de dos localizaciones, ambas de productores de la cooperativa FRUTALCOOP en San Marcos de Tarrazú. El material se preservó en la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, a -5°C hasta ser procesado, separándose en pulpa y cáscara, para luego someterse a un proceso de liofilización en un liofilizador *FreeZone* -105°C, 4.5 L, *Cascade Benchtop Freeze Dry System*, de Labconco. El material liofilizado fue luego nuevamente preservado a -5°C.

El material liofilizado se sometió a extracción bajo un método que se optimizó con análisis factorial en un instrumento de extracción acelerada por solvente (ASE) marca *Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 150 Accelerated Solvent Extractor system*, usando acetona:agua como solvente en celdas de 34 mL a 40°C. La acetona fue removida utilizando un rotavapor Buchi™ 215 y el extracto acuoso obtenido fue lavado con  $\text{CHCl}_3$  y acetato de etilo consecutivamente. Luego, los solventes orgánicos fueron removidos con el rotavapor Buchi™ 215 y el extracto acuoso fue conservado a -5°C para posterior purificación.

Cada uno de los extractos acuosos fue sometido a separación en una columna conteniendo Amberlite XAD-7 (Sigma-Aldrich), utilizando gradientes de solventes: agua, agua: metanol, metanol en diferentes relaciones, y metanol (2% ácido acético) sucesivamente. Las fracciones recolectadas fueron evaporadas a sequedad en un rotavapor Buchi™ 215.

### Análisis de polifenoles totales

Las muestras fueron evaluadas según una modificación propia del método de Singleton y Rossi [21], el cual se basa en la oxidación de los grupos hidroxilo en medio básico por el reactivo de *Folin-Ciocalteu* (FC), en el que la absorbancia es medida a 750 nm en un espectrofotómetro *UV-Vis Thermo Scientific™ GENESYS 10S*. Para la cuantificación, los valores de absorbancia fueron extrapolados en una curva de calibración de ácido gálico y los valores de FC fueron expresados en mg de ácido gálico equivalentes (GAE) / g muestra. Los análisis fueron realizados en triplicado.

### Análisis de polifenoles por HPLC-MS

El sistema de cromatografía líquida (HPLC) y espectrometría de masas (MS) usado para analizar las muestras de *Malus domestica* variedad Ana, consistió en un LTQ Orbitrap XL con una bomba binaria Accela 1250, un automuestreador PAL HTC Accela TMO, un detector PDA (*ThermoFisher Scientific, San Jose, CA*), y un compartimiento de columna G1316A (*Agilent, Palo Alto, CA*). La separación fue llevada a cabo en una columna Hypersil Gold AQ RP- C18 UHPLC (200 mm x 2.1 mm i.d., 1.9  $\mu\text{m}$ , *ThermoFisher Scientific*) con una pre-columna UltraShield (*Analytical Scientific Instruments, Richmond, CA*) con un flujo de 0.3 mL/min. La fase móvil consistía de A (0.1% ácido fórmico en agua, v/v) y B (0.1% ácido fórmico en acetonitrilo, v/v). El gradiente lineal cambió de 4% a 20% B (v/v) a 40 min, hasta 35% B a 70 min y a 100% B a 71 min, y se conservó a 100% B hasta 75 min. El espectro UV/Vis fue registrado entre 200-700 nm. Se utilizó modo de ionización negativo y las condiciones fueron gas a 70 (unidades arbitrarias), auxiliar y gas de barrido a 15 (unidades arbitrarias), voltaje spray a 4.8 kV, temperatura capilar a 300 °C, voltaje capilar a 15 V, y de lente de tubo a 70 V. El rango de masas fue de 100 a 2000 amu con una resolución de 30,000, FTMS AGC target a 2e5, FT- MS/MS AGC target a 1e5, aislamiento de 1.5 amu, y máximo tiempo de inyección de 500 ms. El ion más intenso fue seleccionado para los iones de  $m/z$  a  $m/z$  respectivamente, con una energía normalizada de colisión a 35%.

### Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los análisis para obtener los espectros de  $^{13}\text{C}$  - RMN fueron realizados en un instrumento Bruker Ascend 400 MHz, utilizando como solvente deuterado para la disolución de las muestras  $\text{CD}_3\text{OD}:\text{CF}_3\text{COOD}$  (5%).

### Evaluación de la capacidad antioxidante

El método ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) se basa en las propiedades fluorescentes de la fluoresceína (FL) en soluciones alcalinas y la medición de la capacidad de absorción de radicales oxígeno. La reacción se llevó a cabo a 37 °C en una solución tampón de fosfato 75mM (PBS). El compuesto antioxidante (Trolox [1-8  $\mu\text{M}$ ] utilizado para la recta de calibrado o el extracto antioxidante en diferentes concentraciones) junto con la fluoresceína se pre-incubó durante 10 min a 37 °C. A continuación, se adiciona AAPH (2,2'-Azobis (2-Amidino-Propano) Dihidroclorado) y se incubó a 37 °C, midiendo la fluorescencia durante 98 minutos, empleando un lector de placas con filtros de emisión y excitación. La medida de fluorescencia del equipo se controla mediante software. Las placas utilizadas son microplacas negras de 96 pocillos. Todas las mezclas de reacción se prepararon por duplicado y se llevaron a cabo por lo menos 3 ensayos independientes para cada muestra. Las curvas de fluorescencia se normalizan con respecto a la curva del blanco (sin antioxidante) y a partir de las curvas normalizadas se calcula el área bajo la curva (área bajo la curva, AUC). Una vez obtenida el área neta se calcula la ecuación de regresión entre el AUCneta y la concentración de antioxidante. La pendiente de la ecuación se utiliza para calcular el valor de ORACFL mediante la recta patrón obtenida a partir del Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E). Los valores finales de ORAC se expresan en  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalentes (TE) por mg de muestra utilizada para la obtención del extracto.

### Componente 3 Capacitación y divulgación

Como los resultados de estos estudios pueden añadir un valor agregado a los productores, se ofrecieron capacitaciones para socializar los nuevos conceptos técnicos y se les dio acompañamiento para la divulgación de sus productos con el fortalecimiento del análisis de los datos encontrados en cada componente y en apoyo al proceso de comercialización de

la manzana. Se realizaron talleres de realimentación con la cooperativa FRUTALCOOP y se organizó un programa radial y uno televisivo.

## Resultados y Discusión

### Componente 1. Manejo agro-ecológico y biocontrol

#### a) Árboles georeferenciados:

En el cuadro 1 se muestran las georreferencias de los árboles donde se colectó las muestras para los análisis de laboratorio.

**Cuadro 1.** Georreferencias de árboles de manzana (*Malus domestica*) ubicados en la Zona de los Santos.

Variedad	Georreferencia		
ANA (F)	N 09° 36' 54.2	W 083° 59' 27.3	3m
ANA (C)	N 09°40'16.01	W 083° 54' 12.81	0m
JONAS	N 09° 36' 54.2	W 083° 59' 27.3	3m

#### b) Estado del suelo:

Los rangos de concentraciones obtenidas de los principales parámetros físicos y químicos analizados en las muestras de suelos de cultivos de manzana recolectados, se presentan en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Resultados de análisis de suelos estudiados

Parámetro	Rango	
Densidad aparente	0,50 – 0,72	g cm <sup>-3</sup>
Densidad de partícula	2,38 – 2,60	g cm <sup>-3</sup>
Porosidad	70,30 – 80,00	%
Espacio aéreo	0,48 – 0,64	%
Densidad volumétrica	11,48 – 16,20	%
Conductividad eléctrica	472 - 655	µs cm <sup>-1</sup>
pH	5,36 - 5,64	
Ca	33,83 - 160,4	cmol L <sup>-1</sup>
Mg	2,2 - 4,5	cmol L <sup>-1</sup>
K	1,26 - 1,96	cmol L <sup>-1</sup>
Acidez	0,30 - 0,45	cmol L <sup>-1</sup>
P	5,5 - 8,4	mg L <sup>-1</sup>
Fe	46 - 79	mg L <sup>-1</sup>
Cu	2,8 - 5	mg L <sup>-1</sup>
Zn	4,8 - 11,6	mg L <sup>-1</sup>
Mn	28,3 - 40,8	mg L <sup>-1</sup>
MO	7,90 -10,85	%

De acuerdo con los resultados obtenidos (cuadro 2), es de reconocer preliminarmente que se trata de suelos un poco ácidos con muy buena porosidad y densidad, así como una aireación también óptima. El contenido de materia orgánica es óptimo, lo cual aporta al proceso de determinación de microorganismos de suelo. Los resultados obtenidos de textura mostraron valores de arena, arcilla y limo de aproximadamente 69,19 %, 6,70 % y 24,14 % respectivamente, lo que indica que estos suelos corresponden al tipo franco arenoso.

Es importante indicar que las concentraciones de calcio (Ca) y de magnesio (Mg) en los suelos, son de las características de fertilidad de mayor importancia para la nutrición de los cultivos y los rangos obtenidos de ambos macronutrientes son óptimos para este cultivo. Con respecto al manganeso (Mn), este es indispensable en el fotosistema y la activación de enzimas en el metabolismo vegetal, así como el hierro (Fe) y el cinc (Zn), los cuales ayudan en la nutrición de las plantas.

Las concentraciones encontradas de estos micronutrientes en las muestras analizadas mostraron valores dentro del rango óptimo, 28,3 - 40,8 mg L<sup>-1</sup>, 46 - 79 mg L<sup>-1</sup>, 4,8 - 11,6 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, es decir son suficientes para suplir las necesidades nutricionales de las plantas.

Por otro lado, se encontró que estos suelos presentan deficiencias en la concentración de fósforo, encontrada, pues los valores de los resultados obtenidos son inferiores al nivel crítico, que es de 12 mg L<sup>-1</sup> por lo que se considera que es deficiente o bajo. Debido a que el contenido de fósforo ayuda en la formación de los órganos reproductores como los frutos, su contenido debe ser suficiente, por lo que se ha retroalimentado al respecto con los productores para que se tomen las medidas correctivas en cuanto a la disponibilidad de este micronutriente.

### c) *Microorganismos*

Para el análisis de las muestras colectadas se utilizaron medios enriquecidos para los procesos de aislamiento de algunos organismos deseables, como hongos de los géneros *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* y bacterias como *Bacillus*; lográndose aislamientos de los géneros *Trichoderma* a partir de las muestras suelo, y *Metarhizium* a partir de las muestras de hojas y ramas. Además de uno de los insectos se aisló una cepa de *Bacillus thuringiensis*. Las cepas fueron identificadas y conservadas en el laboratorio.

Una vez purificados y conservados los aislamientos se dio inicio a las pruebas de eficacia, antagonismo y patogenicidad. Con esto se seleccionaron los microorganismos más promisorios para su reproducción y cultivo. En efecto, para cada uno de ellos se probó una técnica de reproducción en el laboratorio, buscando la reproducción masiva de microorganismos, a través de una metodología que fuera cien por ciento reproducible (semi-artesanal) por parte de los productores de Frutalcoop.

La escogencia del sustrato adecuado, las cantidades apropiadas y el tipo de fermentación que produjeran el mayor número de esporas o de células, permitieron determinar que la mejor fermentación era la de carácter sólido para tres de los microorganismos y líquida en el caso de *Bacillus* spp, obteniéndose un mínimo de esporas o células esperadas de 1.0 x 10<sup>7</sup> conidios/g.

Por otro lado, en el caso de *Bacillus* spp, las conclusiones obtenidas para la fermentación de tipo líquido, fueron la utilización de un medio compuesto, de fórmula (g/l): NaNO<sub>3</sub> 15; Sacarosa 60; CaNO<sub>3</sub> 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5; Melaza, 20; pH: 6; lográndose condiciones óptimas esterilizando, debiéndose inocular a una temperatura no mayor de 30° C con un disco de 6mm de diámetro del medio de cultivo agar nutritivo totalmente cubierto por la bacteria; incubándose en agitación; para obtener de esta forma, un mínimo de esporas o células esperadas de 1.0 X 10<sup>8</sup> U.F.C/mL.

Los organismos aislados demuestran como las comunidades de microorganismos se adaptan para buscar la regulación de poblaciones de patógenos y plagas dentro de sistemas agrícolas

con enfoque de manejo integrado y de prácticas sostenibles de cultivo. Además, el aislamiento y el cultivo de los mismos permiten que los productores entiendan y aprovechen el potencial que tiene la biodiversidad que puede encontrarse asociada a los ecosistemas productivos como una herramienta para generar valor agregado a sus productos a través de la conservación y el combate biológico.

## Componente 2. Contenido Polifenólico y Capacidad antioxidante

Según se describió en la metodología, se procedió a realizar la liofilización de las muestras de cáscara y pulpa de las manzanas Ana (C), Jonas y Ana (F), obteniéndose para la primera porcentajes de humedad entre 85 y 89.3 %, es decir valores de rendimientos entre 10.7 y 15 % para las muestras; mientras que los porcentajes de humedad para la variedad Jonas variaron entre 81.7% y 85.6%, es decir los rendimientos mostraron rangos entre 14.4% y 18.3%; por último los porcentajes de humedad variaron entre 79% y 85.3% para la variedad Ana (F); para mejores rendimientos promedio de las tres variedades, entre 14.7% y 21%.

Con las muestras liofilizadas, se procedió a realizar la extracción, empleando Extracción Acelerada por Solvente (ASE), con solventes orgánicos y acuosos, empleando condiciones definidas de presión y temperatura, y ciclos de extracción, como se ha explicado. Las muestras liofilizadas obtenidas se purificaron a través de la aplicación de la metodología descrita, con columnas cromatográficas de resina Amberlite XAD-7, que permitieron la obtención de extractos enriquecidos en polifenoles, con rendimientos que variaron entre 10.7 y 29.4 mg de extracto/g liofilizado para la variedad Ana (C); entre 14.5 y 26.1 mg extracto/g liofilizado en el caso de la variedad Jonas; y entre 23.9 y 64.4 mg extracto/g liofilizado para la variedad Ana (F), es decir valores superiores para esta última con respecto a los de las otras variedades.

En cuanto al contenido polifenólico de los extractos, se realizó la aplicación del método de Folin-Ciocalteu, para determinar la cantidad total de polifenoles presentes en los mismos, realizándose estas valoraciones por triplicado, obteniendo valores de desviación estándar adecuados. Se obtuvieron valores promedio que oscilan entre los  $579.0 \pm 20.9$  GAE / g extracto y  $619.6 \pm 19.6$  GAE/ g extracto seco para la variedad Ana (C). Asimismo, la evaluación del contenido total polifenólico para las otras variedades, mostró valores promedio entre los  $361.0 \pm 7.1$  GAE / g extracto y  $436.5 \pm 6.7$  GAE/ g extracto seco, en el caso de la variedad Jonas; mientras que se obtuvieron valores promedio entre los  $468.0 \pm 4.8$  GAE / g extracto y  $614.0 \pm 4.4$  GAE/ g extracto para la variedad Ana (F); observándose mayor contenido total de polifenoles para la variedad Ana.

En lo que respecta a la caracterización de los polifenoles, se logró por UHPLC-HRMS, bajo las condiciones descritas en la metodología, la identificación de 28 compuestos en la cáscara de la manzana variedad Ana (C), de mayor contenido polifenólico, incluyendo nueve flavan-3-oles, entre ellos catequina, epicatequina, dímeros y trímeros y tetrámeros de procianidinas tipo B; tres ácidos, incluyendo derivados de hidroxicinámico y cumárico; ocho flavonoides, incluyendo glicósidos derivados de quercetina, miricetina y kaempferol, así como tres chalconas, incluyendo derivados de fletetina. En cuanto a la pulpa, se encontró un número similar de compuestos, pero de forma distintiva un mayor número y diversidad de flavan-3-oles, incluyendo tres dímeros de procianidina de tipo B, tres trímeros de tipo B y dos dímeros de procianidina de tipo A y derivados de la dihidrochalcona fletetina.

El análisis de  $^{13}\text{C}$ -RMN muestra en la región de 175-180 ppm los C=O de las flavonas (como la quercetina y derivados glicosilados), mientras que en la región 160-165 ppm se aprecian los enlaces C-OH del anillo A (carbonos C5 y C7). Estos mismos carbonos en los flavan-3-oles (como catequina, epicatequina y polímeros de procianidina) aparecen en 155-160 ppm, junto a los C2 y C9 de las flavonas. Para flavonas y flavan-3-oles en la zona 143-152 ppm se ubican los



C-OH del anillo C (carbonos C3' y C4'), en 130-135 los C1', en 114-122 los carbonos C2', C5' y C6', en 100-105 ppm los C10. En la región 90-100 ppm se observan los C6 y C8 de las flavonas y flavan-3-oles, así como los carbonos anoméricos de los glicósidos presentes. Asimismo, se aprecian gran cantidad de señales en 65-80 ppm correspondientes con los C-OH de los glicósidos, y un grupo más reducido de señales en aproximadamente 63 ppm que coincide con el CH<sub>2</sub>OH de los glicósidos; apreciándose una mayor cantidad e intensidad en las señales de stos últimos en la muestra de cáscara. También son observables señales características del floretin y sus derivados, tal como a 206 ppm la señal de C=O, a 47 ppm la del carbono  $\alpha$  y en 30-32 ppm señales que se asocian al carbono  $\beta$ . Finalmente, se observan señales de ácidos hidroxicinámicos tal como la de C1 a 128 ppm, y de ácidos coumáricos tal como las señales a 135-137 ppm del C4.

Por último, se procedió a realizar la evaluación del potencial antioxidante in-vitro por el método ORAC, según lo descrito en la metodología. De esta forma, una vez realizadas las mediciones por triplicado, con el área bajo la curva y la ecuación de regresión, se obtuvieron valores de capacidad antioxidante entre  $11.2 \pm 0.1$   $\mu\text{mol TE/mg extracto}$  y  $16.8 \pm 0.3$   $\mu\text{mol TE/mg extracto}$  para las muestras de *Malus domestica* variedad Ana (C), como se aprecia, con valores de desviación estándar adecuados. Esta evaluación de potencial antioxidante realizada con los extractos de la variedad Jonas mostró valores que oscilan entre  $7.6 \pm 0.1$   $\mu\text{mol TE/mg extracto}$  y  $10.2 \pm 0.2$   $\mu\text{mol TE/mg extracto}$ ; mientras que en el caso de los extractos de la variedad Ana (F), los valores de potencial antioxidante tuvieron un rango entre  $10.3 \pm 0.2$   $\mu\text{mol TE/mg extracto}$  y  $10.6 \pm 0.3$   $\mu\text{mol TE/mg extracto}$ ; pudiéndose observar así mejores valores para la variedad Ana (C), lo que es acorde con la cuantificación de fenoles totales en las muestras.

### Componente 3. Capacitación y divulgación

Las capacitaciones impartidas consistieron en talleres con la información técnica de los análisis que se llevaron a cabo en los laboratorios de cada universidad, en el tema de polifenoles (alcances internacionales de estos contenidos), análisis de suelos y determinación de microorganismos. Se trabajó en conjunto con los miembros de la cooperativa en el diseño de banners y etiquetas para que se utilicen en los puestos de venta en las Ferias del Agricultor y en los frutos dentro de empaques, caracterizando el producto para fortalecer el encadenamiento productivo.

Se realizó asimismo la transferencia de información y tecnología por parte del Laboratorio de Control Biológico del TEC, en el diseño de biofábricas, a los productores de la zona de Copey de Dota, incluyendo el aislamiento, crecimiento y aplicación de microorganismos al suelo para disminuir los costos en el uso de agroquímicos; preparación de inóculos, matrices y bolsas de reproducción, condiciones adecuadas para la incubación y adecuadas para la conservación de producto final, así como la aplicación segura y eficaz de bioproductos en campo. Por último, se capacitó sobre la infección de insectos para revitalizar hongos entomopatógenos, pruebas de antagonismo y revitalización de hongos antagonistas, así como en materiales, reactivos, e insumos para la biofábrica.

Cabe destacar que se ha logrado complementariedad con la Dirección de Programas Nacionales del MAG, con el INTA e INDER, con el fin de coordinar acciones con los productores, y que dada la relevancia de los resultados y la temática en el ámbito nacional, se dieron eventos de divulgación, como la grabación en el programa radial Costa Rica Campesina de Radio Monumental en agosto del 2015, donde participaron investigadores y el presidente de FRUTALCOOP, así como una entrevista en noviembre del 2015 en el programa radial denominado Impacto TEC; y una grabación en el programa ConCiencia de Canal 15 en Febrero del 2016.

Lo anterior evidencia la vinculación de la universidad pública con diferentes organizaciones, lo que le permite ser facilitadora en el desarrollo y quehacer nacional.

## Conclusiones

En la presente investigación se desarrollaron estudios del contenido polifenólico en tres muestras compuestas de dos variedades de la especie *Malus domestica*, cultivadas en la zona de Los Santos, en Costa Rica, por su importancia económica para los productores de la región. Se cuenta con productores capacitados en el manejo agroecológico de las especies no solo con agricultura tradicional sino con la obtención y aplicación de microorganismos como agentes de biocontrol para disminuir el consumo de agroquímicos. Asimismo, se lograron obtener extractos enriquecidos en polifenoles, de las cáscaras y pulpas de las variedades estudiadas, y evaluar su contenido polifenólico total, así como su capacidad antioxidante, lo que mostró valores importantes para todas las variedades, comparativamente con mejores resultados para la variedad Ana (C). Cabiendo sin embargo remarcar que los rendimientos del extracto polifenólico, luego de los procesos de liofilización, extracción y cromatografía, son mejores para la variedad Ana (F). Los resultados de cromatografía líquida y espectrometría de masa, apoyados por los análisis de RMN, indican variabilidad de contenido, con riqueza en oligómeros de flavan-3-oles, reconocidos por su potencial bioactivo, lo que muestra la importancia de este conocimiento científico y su transferencia a los productores, como contribución al posicionamiento de sus cultivos y su desarrollo sostenible.

## Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), a través de su Fondo FORINVES, del gobierno de Costa Rica, por el financiamiento para el presente trabajo de investigación e innovación. Asimismo, se agradece la colaboración del Laboratorio de Investigación en Nutrición del USDA, en análisis de espectrometría de masas. Por último, se agradece la colaboración del Lic. Alonso Quesada en la asignación de *vouchers* en el Herbario Nacional, así como a la Universidad de Costa Rica, al Instituto Tecnológico de Costa Rica, la Universidad Nacional de Costa Rica, y a los productores de la Cooperativa FRUTALCOOP, por el acceso a sus cultivos y la colaboración hacia el desarrollo sostenible de la región.

## Bibliografía

- [1] C. Rodríguez, «Antecedentes de la producción de ciruela (*Prunus domestica*, *Prunus cerasifera*) y manzana var. ana (*Malus domestica*) en la zona de Los Santos. FrutalCoop SRL. Copey de Dota, Costa Rica,» San José, 2014.
- [2] M. y M. C. C. I. Lobo Arias, «Conservación de recursos genéticos de la agrobiodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles,» *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol. 10, n° 1, pp. 33-42, 2009.
- [3] S. Renaud y M. De Lorgeril, « Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.,» *Lancet*, vol. 339, pp. 1523-1526, 1992.
- [4] M. Leopoldini, N. Russo y M. Toscano, «The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants,» *Food Science*, vol. doi:10.1016/ j.foodchem.2010.08.012, 2010.
- [5] M. E., C. Kandaswami y T. Theoharides, «The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer,» *Pharm. Rev.* , vol. 52, p. 673-839, 2000.
- [6] T. Requena, M. Monagas, M. Pozo-Bayón, P. Martín-Álvarez, B. Bartolomé, R. Del Campo, M. Ávila, M. Martínez-Cuesta, C. Peláez y M. Moreno, «Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota.,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, pp. 332-344, 2010.

- [7] X. Tzounis, J. Vulevic, G. Kuhnle, T. George, J. Leonczak, G. Gibson, C. Kwik-Urbe y J. Spencer, «Flavonolmonomer-induced changes to the human faecal microflora.,» *British Journal of Nutrition*, vol. 99, pp. 782-792., 2008.
- [8] A. Tapas, D. Sakarkar y R. Kakde, «Flavonoids as Nutraceuticals: A Review.,» *Trop. J. of Pharm. Res.*, vol. 7, n° 3, pp. 1089-1099, 2008.
- [9] R. De la Iglesia, F. Milagro, J. Campión, N. Boqué y A. Martínez, «Healthy properties of proanthocyanidins.,» *BioFactors*, vol. 36, n° 3, pp. 159-168, 2010.
- [10] M. Navarro Hoyos, F. Sánchez-Patán, R. Murillo Masis, P. Martín-Álvarez, W. Zamora Ramirez, M. Monagas y B. Bartolomé, «Phenolic Assesment of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw): Leaves, Stem, Bark and Wood Extracts.,» *Molecules*, 20, 22703-2271, vol. 20, pp. 22703-22717, 2015.
- [11] T. Kahlon y G. Smith, « In vitro binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp.), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria X ananassa*), cherries (*Malpighia punicifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*).,» *Food Chemistry*, vol. 100, pp. 1182-1187, 2007.
- [12] E. De la Cruz, J. Pino, M. Moreno, M. Cañadas y J. Ruiz-Risueño, «Micronutrientes antioxidantes y actividad física: evidencias de las necesidades de ingesta a partir de las nuevas tecnologías de evaluación y estudio del estrés oxidativo en el deporte,» *Retos: Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación.*, vol. 13, pp. 11-14, 2008.
- [13] T. Kanda, H. Akiyama, A. Yanagida, M. Tanabe, Y. Goda, M. Toyoda, R. Teshima y Y. Saito, « Inhibitory Effects of Apple Polyphenol on Induced Histamine Release from RBL-2H3 Cells and Rat Mast Cells. Biosci.,» *Biotechnol. Biochem*, vol. 62, n° 7, pp. 1284-1289, 1998.
- [14] W. S. K. D. K. V. B. S. Mayanka, (2012) Chemical Composition and in vitro Cytotoxic Activity of Essential Oil of Leaves of *Malus domestica* Growing in Western Himalaya (India)., India: Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 649727, 6 p., 2012.
- [15] M. B. U. Stopar, A. Vanzo y U. Vrhovsek, «Lower Crop Load for Cv. Jonagold Apples (*Malus domestica* Borkh.) Increases Polyphenol Content and Fruit Quality.,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, pp. 1643-1646., 2002.
- [16] M. Hossain, S. Salehuddin, M. Kabir, S. Rahman y H. Vasantha, «Sinensetin, rutin, 30-hydroxy-5, 6, 7, 40-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit,» *Food Chemistry*, vol. 113, pp. 185-190, 2009.
- [17] A. Schieber, P. Keller, P. Streker, I. Klaiber y R. Carle, «Detection of Isorhamnetin Glycosides in Extracts of Apples (*Malus domestica* cv. "Brettacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI MS/MS.,» *Phytochem. Anal.*, vol. 13, pp. 87-94, 2002.
- [18] E. Weichselbaum, L. Wyness y S. Stanner, «Apple polyphenols and cardiovascular disease – a review of the evidence.,» *Nutrition Bulletin*, vol. 35, pp. 92-101, 2010.
- [19] M. G. S. Leontowicz, H. Leontowicz, R. Krzeminski, A. Lojex, E. Katrich, M. Ciz, O. Martin-Belloso, H. R. Soliva-Fortuny y S. Trakhtenberg, «Apple and Pear Peel and Pulp and Their Influence on Plasma Lipids and Antioxidant Potentials in Rats Fed Cholesterol-Containing Diets,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, pp. 5780-5785, 2003.
- [20] S. Fiskaa, G. Borge, G. Bengtsson, W. Bilger, A. Berge, K. Haffner y K. Solhaug, «Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh, cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation.,» *Postharvest Biology and Technology*, vol. 45, pp. 1-10, 2007.
- [21] R. J. Singleton VL, «Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent.,» *Am J Enol Vitic.*, vol. 16, pp. 144-158, 1965.