

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS DEL
TEOSINTE (*Dioon mejiae*)**

POR:

DANY JOEL ÁVILA DÍAZ



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C-A.

ABRIL, 2023

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS DEL
TEOSINTE (*Dioon mejiae*)**

POR:

DANY JOEL ÁVILA DÍAZ

JHUNIOR ABRAHAN MARCIA FUENTES
Asesor principal

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRONOMO**

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

ABRIL, 2023

I. DEDICATORIA

A DIOS por darme la oportunidad de estar realizando mi trabajo de investigación, por cuidar de mí y de mi familia, por brindarme salud, sabiduría y los conocimientos necesarios, los cuales he apreciado durante toda mi carrera para poder cumplir esta meta tan importante en mi vida.

A mi madre **MIRIAN FRANCISCA DIAZ TORRES** por ser la persona más importante en mi vida, quien ha dado todo por este deseo de triunfar, dándome todo su apoyo y amor.

A mi abuela **LILIA ALEJANDRINA TORRES LOBO** y tía **EVA LETICIA DIAZ TORRES** por ser un ejemplo en mi vida y por todos los valores y enseñanzas que me ha demostrado.

A **ZOILA MARGARITA LICONA MARTINEZ** por ser una persona muy especial y maravillosa desde hace muchos años, quien me ha apoyado, dándome ánimos y siempre creyendo en mí, celebrando cada pequeño logro en mi vida.

En especial a mis hermanos **JOSSELINE BETHEL SANCHEZ DIAZ Y CRISTIAN AZAEL AVILA DIAZ**, que siempre me apoyaron y creyeron en mí, siendo uno de sus deseos verme cumplir esta meta, convirtiéndose en una de mis mayores fortalezas y motivaciones.

A mis compañeros y amigos por ayudarme en esta lucha y por compartir alegrías durante los años que hemos estado aprendiendo juntos, en especial a: **Cristhian Obed Acosta Carias, Emerson Enox Figueroa Caceres, Nelson Uriel Aguilar Laínez, Lenin Jose Arita Erazo, Marian Yulissa Adriano Medina Y Maria Jose Alvarado Castaneda.**

II. AGRADECIMIENTO

A mi **DIOS** todo poderoso por estar a mi lado en todo momento, en especial en los más difíciles, en los que solo él fue capaz de ayudarme para alcanzar este objetivo, por iluminarme, por la sabiduría y fortaleza para poder culminar con éxito mis estudios.

A la **Universidad Nacional de Agricultura** por ser la mejor oportunidad de superación, donde he tenido grandes enseñanzas, tanto de las ciencias agrarias como de la vida. Y de igual forma a todo el cuerpo de catedráticos que me ayudaron en la formación ética y profesional, siempre con el fin de formar profesionales de calidad, el cual nos identifica como miembros egresados de esta gran casa de estudios.

A los **M.Sc. Jhunion Marcia, Rene Cáceres, Javier Betancourth Y Yoni Antúnez** por su dedicación a la investigación y sus valiosos aportes basados en su experiencia a lo largo de su desempeño como profesionales, los cuales agradezco grandemente.

A la **Universidad Estatal De Louisiana (LSU)** por darme la oportunidad de realizar el trabajo de mi investigación. De igual forma a los **PhD. David Picha Y Ricardo Santos** por ayudarme con sus amplios conocimientos, disponibilidad y amabilidad que demostraron durante mi estadía, y a todo el personal que me brindó el apoyo en las actividades realizadas.

TABLA DE CONTENIDO

.....	Pág.
I. DEDICATORIA	2
II. AGRADECIMIENTO	3
III. RESUMEN	vi
IV. INTRODUCCIÓN	1
V. OBJETIVOS	2
5.1 Objetivo General:.....	2
5.2 Objetivos Específicos:	2
VI. REVISIÓN DE LITERATURA	3
6.1 Teosinte (<i>Dioon mejiae</i>)	3
6.1.1 Clasificación taxonómica del Teosinte (<i>Dioon mejiae</i>)	3
6.1.2 Morfología del teosinte (<i>Dioon mejiae</i>)	4
6.1.3 Composición Nutricional.....	4
6.2 Antecedentes	4
6.3 Compuestos Bioactivos y sus Propiedades.....	6
6.4 Clasificación de Compuestos Bioactivos	7
6.4.1 Compuestos bioactivos inorgánicos:	7
6.4.2 Compuestos bioactivos orgánicos:	7
6.5 Compuestos Fenólicos.....	8
6.6 Clasificación de los compuestos fenólicos según su estructura básica	8
6.6.1 Fenoles simples.....	8

6.6.2	Polifenoles	8
6.7	Propiedades Bioactivas	9
6.8	Técnicas de Extracción y Caracterización de Compuestos Fenólicos	10
6.8.1	Técnicas generales de extracción y caracterización de compuestos fenólicos	10
6.8.2	Extracción de fluidos a presión (PFE)	11
6.9	Caracterización de Compuestos Fenólicos	12
6.9.1	La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	12
6.9.2	Cromatografía de Gases.....	13
6.9.3	Descripción del Cromatógrafo de Gases	15
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1	Descripción del lugar donde se desarrolló la investigación.....	16
7.2	Reactivos	16
7.3	Material vegetal.....	17
7.4	Diseño de experimentos	17
7.5	Captación de radicales y polifenoles totales	19
7.6	Contenido total de Carotenoides	20
7.7	Determinación por HPLC de azúcares y ácidos orgánicos	21
7.7.1	Preparación de patrones y muestras.....	21
7.7.2	Operación HPLC	21
7.7.3	Estándares de ácidos orgánicos	22
7.8	Análisis HPLC-ESI-TOF-MS	22
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
8.1	Actividad antioxidante de diferentes fuentes vegetales	24
8.2	Concentración Fenoles Totales.....	24
8.3	Concentración total carotenoides	25

8.4	Concentración de Antioxidantes.....	26
8.5	Perfil de azúcar y ácidos orgánicos	27
8.6	Discusión	29
IX.	CONCLUSIONES	30
X.	RECOMENDACIONES.....	31
XI.	BIBLIOGRAFÍAS	32
XII.	ANEXOS.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del teosinte (<i>Dioon mejiae</i>).....	3
Tabla 2 Modelo compuesto central 23. Valores de factores independientes.....	18
Tabla 3 Concentración fenoles totales.....	24
Tabla 4 Concentración total carotenoides.....	25
Tabla 5 Concentración de Antioxidantes.....	26
Tabla 6 Contenido de fenoles totales, contenido de carotenoides totales y actividad antioxidante del <i>Dioon mejiae</i>	27
Tabla 7 Pico de Resultados de Azucares	27
Tabla 8 Perfil de azúcar del <i>Dioon mejiae</i>	28
Tabla 9 Resultado ácidos orgánicos <i>Dioon mejiae</i>	28
Tabla 10 Perfil de ácidos orgánicos de <i>Dioon mejiae</i>	28

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Calibración para la Obtención de contenido Total de Fenoles	39
Anexo 2. Curva de Calibración para la Obtención de Contenido Total de Fenoles.....	40
Anexo 3. Resultados de Contenido Total de Fenoles.....	41
Anexo 4. Calibración para la Obtención de Contenido de carotenoides Totales	42
Anexo 5. Curva de Calibración para la Obtención de Contenido de carotenoides Totales..	43
Anexo 6. Resultados de contenido de carotenoides totales.....	44
Anexo 7. Calibración para la Obtención de Antioxidantes	45
Anexo 8. Curva de Calibración para la Obtención de Antioxidantes	46
Anexo 9. Resultados de Contenido de Antioxidantes	47
Anexo 10. Resultados de Contenido total de ácidos orgánicos.....	48
Anexo 11. Resultados de contenido total de azúcares.....	48
Anexo 12. Proceso para la obtención de harina de <i>Dioon mejiae</i> (teosinte).....	49
Anexo 13. Insumos y equipo de laboratorio para la extracción de moléculas bioactivas	50
Anexo 14. Insumos y equipo de laboratorio para la extracción de moléculas bioactivas	51
Anexo 15. Equipo de laboratorio para la validación de moléculas bioactivas	52
Anexo 16. Programas SciFinder y PubChem. para la identificación de moléculas bioactivas	53
Anexo 17. Realización de actividades en laboratorio	54
Anexo 18. Equipo de laboratorio	55

Ávila Diaz C.A. 2023. Obtención y caracterización de moléculas bioactivas del teosinte (*Dioon mejiae*), Tesis Experimental, Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras C.A. 68p.

III. RESUMEN

El presente trabajo describe la realización de una tesis de grado, realizada en el laboratorio de Ciencias de Alimentos en la Universidad Estatal de Louisiana, Estados Unidos. En un periodo de seis meses (Julio 2022 – Enero). Esta investigación se realizó con el objetivo de determinar la composición de moléculas bioactivas de la harina de teosinte (*Dioon mejiae*) mediante análisis instrumental que promueven la buena salud en humanos. Se utilizaron los estróbilos microsporangiados y los macrosporangios obtenidos del Teosinte (*Dioon mejiae*), cosechados en las comunidades de Río Grande y Sagüey, Municipio de Gualaco, Departamento de Olancho. Se determinó la composición de moléculas bioactivas utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM) para evaluar el efecto de los parámetros PLE sobre la recuperación y el rendimiento de compuestos fenólicos, utilizando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.1.02. El modelo de diseño que se aplicó fue un diseño compuesto central 23 Modelo (CCD) con dos puntos axiales y dos niveles (máximo y mínimo) para cada variable independiente. Los Compuestos Fenólicos Totales (TPC) se midieron mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y una técnica colorimétrica, los carotenoides y sus ésteres fueron extraídos convencionalmente de *Dioon mejiae* (DM) liofilizada utilizando el proceso descrito con pequeñas modificaciones. Los resultados mostraron abundante contenido de moléculas bioactivas, de los cuales se obtuvieron de contenido total de fenoles (TPC) $305.73 \pm 9.05 \mu\text{g GAE/ml}$, contenido de carotenoides totales (TCC) $8.65 \pm 0.45 \text{ mg Q/ml}$ y actividad antioxidante $38.78 \pm 2.05 \%$ de la fuente vegetal de teosinte. *Dioon mejiae* (DM) indicó TCC alto con diferencias significativas (7.65 ± 0.32 , $8.65 \pm 0.45 \text{ mg Q/ml}$ respectivamente). DM tiene cantidades significativamente diferentes ($P < 0.05$) de TPC, TCC y actividad antioxidante. Llegando a la conclusión que harina de *Dioon mejiae* (teosinte) presenta abundantes compuestos bioactivos como potencial ingrediente funcional, promoviendo así la buena salud en el ser humano.

Palabras clave: Tesis, Composición, Moléculas, Bioactivas, harina, Teosinte, *Dioon mejiae*, análisis, Salud, microsporangiados, macrosporangios, Metodología, Evaluar, Parámetros, Compuestos, Fenoles, Carotenoides, Antioxidante, Liofilizada, Potencial, Funcional, Salud.

IV. INTRODUCCIÓN

La relación inseparable entre salud y alimentación se ha reconocido por lo menos desde hace 2,500 años. Hipócrates, el filósofo griego padre de la medicina, decía: “Permitan a los alimentos sea su medicina y a la medicina, que sea su alimento” (Guzmán *et al.*, 2009). En este sentido, las frutas y verduras son muy apreciadas por sus beneficios para la salud, que están directamente relacionados con el alto número de componentes biológicamente activos presentes en su composición. Estas sustancias, llamadas fitoquímicos bioactivos o moléculas bioactivas, poseen diferentes naturalezas y estructuras muy diversas. Entre estos, los compuestos fenólicos, que se consideran metabolitos secundarios de las plantas, han aumentado el interés científico en diferentes áreas (Frankel *et al.*, 2013).

Las propiedades bioactivas que se han atribuido a los compuestos fenólicos son diversas, y su capacidad antioxidante es el efecto más conocido (del Carmen Villegas Aguilar *et al.*, 2020). Además, se han descrito otras propiedades como anticancerígeno, antiinflamatorio, antihipertensivo, estrogénico, efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, antihormonas, antidiabéticos y antitrombóticos, entre otros (Leyva Jiménez *et al.*, 2019).

El teosinte (*Dioon mejiae*) considerado un fósil viviente es una planta nativa cuyos pseudofrutos son utilizados en la región nororiental de Honduras como alimento. Contiene azúcares, ácidos grasos, aminoácidos, proteínas, minerales y fibras. (Bastias *et al.*, 2020), dicha harina de teosinte es rica en moléculas bioactivas (Marcía *et al.*, 2021). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es la obtención y caracterización de moléculas bioactivas del teosinte (*Dioon mejiae*), como potencial alimento funcional en humanos.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Determinar la composición de moléculas bioactivas de la harina de teosinte (*Dioon mejiae*) mediante análisis instrumental que promueven la buena salud en humanos.

5.2 Objetivos Específicos:

- Obtener moléculas bioactivas de la harina de teosinte (*D. mejiae*) mediante las técnicas de extracción convencionales (microonda asistido y fluido presurizado) y modernas (arrastre de vapor con equipo rota vapor).
- Validar el contenido de las moléculas bioactivas de la harina de teosinte (*D. mejiae*) mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).
- Identificar compuestos bioactivos de la harina de teosinte (*D. mejiae*) mediante programas SciFinder y PubChem.

VI. REVISIÓN DE LITERATURA

6.1 Teosinte (*Dioon mejiae*)

Es una semilla nativa de Honduras (Mora *et al.*, 2015), que se ha utilizado para la elaboración de alimentos a partir de su harina, dicha harina de teosinte es rica en moléculas bioactivas (Marcía *et al.*, 2021b), no obstante, su uso en productos de panificación no ha sido muy estudiados. Por lo tanto, el presente estudio se planteó con el objetivo, Obtener y Caracterizar las Moléculas Bioactivas de la harina de teosinte (*Dioon mejiae*); desarrollando la harina de teosinte, utilizando los estróbilos microsporangiados estos son la semilla y la estructura reproductiva masculina, los macrosporangios son los óvulos que van de dos en dos, es decir la semilla y parte femenina de la planta que se utilizara en la elaboración de harina (Bastias-Montes *et al.*, 2020).

6.1.1 Clasificación taxonómica del Teosinte (*Dioon mejiae*)

Tabla 1 Clasificación taxonómica del teosinte (*Dioon mejiae*)

Reino:	Plantae
División:	Cycadophyta
Clase:	Cycadopsida
Orden:	Cicadales
Familia:	<i>Zamiaceae</i>
Subfamilia:	<i>Encephalartoideae</i>
Tribu:	Diooeae
Genero:	<i>Dioon</i>
Especie:	<i>D. mejiae</i>

(Standley y Standley, 1941).

6.1.2 Morfología del teosinte (*Dioon mejiae*)

Tiene tallos arborescentes, de 1-2 m de alto. Las hojas de 1-2 m de largo con pinnas gradualmente reducidas a espinas en la porción basal, glabras en la madurez; pinnas continuas con el raquis, de 15-22 cm de largo y 1.4-1.7 cm de ancho, generalmente enteras, en especial las que se encuentran en la porción media y apical de la hoja. Estróbilos microsporangados de 70-90 cm de largo y 10 cm de diámetro incluyendo el pedúnculo corto; microsporofilos grisáceos, densamente pubescentes, aplanados y agudos apicalmente; estróbilos macrosporangados ovoides, al menos 40-50 cm de largo y 30 cm de diámetro cuando son jóvenes, atenuados hacia el ápice. Semillas blancas con un apéndice en el extremo de la cálaza, esclerotesta (capa dura interna) áspera (Haynes y Haynes, 2009).

6.1.3 Composición Nutricional

El Teosinte proporciona almidón, harina o sagú que es un glúcido extraído de las semillas. Contiene azúcares, ácidos grasos, aminoácidos, proteínas, minerales y fibras (Bastias-Montes *et al.*, 2020). Asimismo, es un alimento silvestre complementario en la dieta de maíz y frijoles (Maciej Serda, 2013). Por tales características podría emplearse como sustituto o complemento de otras harinas derivadas de otros cereales (maíz, trigo, arroz, entre otros) para la elaboración de productos de panificación en personas con regímenes especiales de alimentación, como fuentes de nutrientes no convencionales ricos en moléculas bioactivas (Marcía Fuentes *et al.*, 2021).

6.2 Antecedentes

La relación inseparable entre salud y alimentación se ha reconocido por lo menos desde hace 2,500 años. Hipócrates, el filósofo griego padre de la medicina, decía: “Permitan a los alimentos sea su medicina y a la medicina, que sea su alimento.” Actualmente se considera que la alimentación de los seres humanos es el conjunto de procesos biológicos, psicológicos

y sociológicos que se relacionan con la ingestión de alimentos que proveen al organismo los nutrientes que necesita, así como lograr la satisfacción intelectual, emocional, estética y sociocultural que le es indispensable para tener una vida plena (Guzmán *et al.*, 2009).

La Asociación Americana del Cáncer estima que 70% de los enfermos con cáncer tiene problemas asociados a algunas deficiencias de nutrientes; por otra parte señala que son tres las principales enfermedades que causan la mayoría de las muertes en el mundo: las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, todas relacionadas con problemas nutricionales. Con el avance de la ciencia y la tecnología fue posible la síntesis química ganando presencia ante otros procedimientos terapéuticos convencionales (Guzmán *et al.*, 2009b).

Sin embargo, aunque los fármacos han perdido optimizar el tratamiento de muchas enfermedades, los enfermos son sometidos a terapias que traen como consecuencia efectos secundarios. Antes estas circunstancias, en otras culturas cobro importancia la búsqueda de alternativas; así como los japoneses fueron los primeros en usar alimentos como posibles fuente de salud y prevención de las enfermedades (Guzmán *et al.*, 2009b).

Esta propuesta fue incorporada en el mundo occidental y fue en 1989 por Dr. Stephen L. Defelice el primero en definir a esta modalidad de alimentos nutraceuticos como “cualquier sustancia que se puede considerar como alimento, el que además de su valor nutricional, aporta a quien lo consume beneficios para la salud y previene enfermedades” (Bonilla, 2021). Los nutraceuticos son compuestos bioactivos (es decir, productos químicos) que son beneficiosos para la salud. Los nutraceuticos pueden producirse de forma natural o bien sintetizarse por medios químicos o biológicos (Dominguez, 2020).

Y los compuestos o moléculas bioactivos son un tipo de sustancia química que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos (como frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales); que al ser consumidos cumplen funciones que promueven la

buena salud, como es la prevención del cáncer, enfermedades del cardiovasculares, enfermedades degenerativas, entre otras (Campos, 2019).

6.3 Compuestos Bioactivos y sus Propiedades

Los compuestos bioactivos son componentes menores de los alimentos que afectan al organismo humano como un sistema biológico, órgano, tejido o célula ya que se aplican en medicina y aplicaciones farmacológicas. (Kris-Etherton *et al.*, 2002). (Cárdenas Baquero *et al.*, 2016) afirman que el consumo de estos fotoquímicos como fitoesteroles, ácidos grasos, carotenoides, péptidos, provitamina A y polifenoles pueden tratar y prevenir enfermedades como el cáncer, la diabetes, los trastornos neurodegenerativos y las enfermedades cardiovas.

El origen del desarrollo de estas enfermedades puede deberse, entre muchas causas, a la desintegración de la membrana celular inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daños en las proteínas de membrana e incluso pueden generar Mutación de ADN. (Xiao *et al.*, 2014). Por su capacidad antioxidante y los altos niveles de algunas vitaminas como vitamina A (retinol), muchos estudios se han centrado en los efectos potenciales de ciertos compuestos bioactivos contra el desarrollo de diferentes tipos de cáncer que han demostrado inhibición de la proliferación celular en células malignas de riñón y puede reducir el crecimiento de células cancerosas endometriales (Wegert *et al.*, 2011).

Asimismo, la vitamina D en su forma de D2 (ergocalciferol) y D3 (colecalciferol) tiene efectos positivos sobre las células cancerígenas de la próstata y precursores del cáncer de ovario (Shen *et al.*, 2011). Además, algunos minerales como el zinc actúan favorablemente contra las células cancerosas de colon (Cohen *et al.*, 2012), y polifenoles como las isoflavonas han demostrado su eficacia contra las células malignas de la próstata y proantocianidinas sobre células cancerígenas de cabeza y cuello (Sun *et al.*, 2012). Además, una dieta rica en alimentos con propiedades funcionales mejora el sistema inmunitario previene la obesidad y ayuda a preservar varios órganos como el cerebro, corazón y páncreas (Barbera, 2010).

6.4 Clasificación de Compuestos Bioactivos

6.4.1 Compuestos bioactivos inorgánicos:

Minerales como calcio, selenio, zinc, potasio o cobre (Olmedilla y Granado 2007). Los minerales son elementos que se encuentran en la tierra y los alimentos y son esenciales para la vida. Por ejemplo, los minerales son necesarios para el funcionamiento del corazón y el cerebro, así como para la producción de hormonas y enzimas. Los minerales se dividen en dos categorías según la cantidad que necesita el cuerpo humano. Los macrominerales son necesarios en mayores cantidades e incluyen calcio, potasio, sodio, cloruro, fósforo y magnesio. Aunque igualmente importantes, los oligoelementos, que incluyen hierro, cobre, fluoruro, selenio, zinc, cromo, molibdeno, yodo y manganeso, se necesitan en cantidades más pequeñas (Castro, 2021).

6.4.2 Compuestos bioactivos orgánicos:

Isoprenoides (terpenoides) como carotenoides, saponinas, tocotrienoles, tocoferoles, y terpenos. Hidratos de carbono y derivados del tipo como ácido ascórbico, oligosacáridos y polisacáridos como el almidón. Proteínas, aminoácidos y derivados nombrando isotiocianatos, capsaicinoides, compuestos alil-S, indoles y folatos. Lípidos, incluidos los ácidos grasos insaturados (un ejemplo de los cuales es el omega 3) y fitoesteroles. Compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, taninos, lignanos, flavonoides, entre otros (Olmedilla y Granado 2007).

6.5 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se generan a través de la Metabolización de fenilpropanoides en el ácido shikímico de plantas y pentosa. Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Junto con las vitaminas, los compuestos fenólicos se consideran importantes antioxidantes en la dieta, por ejemplo, se encuentran presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales (Peñarrieta *et al.*, 2014).

Pueden contribuir a los atributos sensoriales de los productos alimenticios, especialmente en bebidas de origen vegetal que dan sabores astringentes. Su ingesta está relacionada con varios efectos beneficiosos considerándolos como importantes antioxidantes en la dieta, y comúnmente se pueden encontrar en vegetales, cereales, frutas y raíces (Gomez, 2010).

6.6 Clasificación de los compuestos fenólicos según su estructura básica

6.6.1 Fenoles simples

En este grupo, estos compuestos se caracterizan por tener al menos un hidroxilo grupo unido a un anillo aromático. Los fenoles, las benzoquinonas y los ácidos fenólicos son los más comunes, y también pueden incluir los ácidos benzoico, fenilacético y cinámico. Además, cubre acetofenonas, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas entre las que se encuentran las cromonas y las naftoquinonas (Gomez, 2010).

6.6.2 Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en plantas y se caracterizan por tener más de un grupo fenol en su molécula. Entre estos, encontramos flavonoides, quercetina, ligninas y lignanos, kampferol, catequinas y otros que se distribuyen en diferentes alimentos de origen vegetal. Se trata de compuestos que no tienen función

nutritiva, no aportan calorías y no son como las vitaminas o minerales. Sin embargo, constituyen sustancias bioactivas que pueden impactar de diferentes forma en nuestro cuerpo y su funcionamiento (Ríos-Hoyo *et al.*, 2015).

Otra clasificación común es diferenciarlos entre flavonoides y no flavonoides (Gonçalves *et al.*, 2013; Valencia-Avilés *et al.*, 2017): Los flavonoides son el grupo más abundante de fitoquímicos que incluyen flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas, dihidroflavonoles, antocianidinas, y chalcones. Los componentes fenólicos no flavonoides en los alimentos incluyen ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, polifenoles volátiles, estilbenos y lignanos, y cumarinas. Estos compuestos son conocidos por tener múltiples unidades de fenol (Gonçalves *et al.*, 2013).

Los polifenoles incluyen xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, lignanos, neolignanos, taninos y lignanos. Los más abundantes en la dieta son los ácidos fenólicos y los flavonoides (Gonçalves *et al.*, 2013). También se pueden clasificar por el grado de solubilidad. Los compuestos solubles en agua incorporan ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides y quinonas, mientras que los insolubles en agua incluyen taninos, ligninas y hidroxicinámicos ácidos, que comúnmente se unen a la pared celular de las células vegetales (Haminiuk *et al.*, 2012).

6.7 Propiedades Bioactivas

Las propiedades bioactivas que se han asociado a los compuestos fenólicos son muy diversos, incluyendo anticancerosos, antiinflamatorios, antihipertensivos y características estrogénicas. Además, pueden ejercer efectos potencialmente beneficiosos contra las enfermedades cardiovasculares y puede proporcionar importantes ventajas en cuanto a la inhibición de los efectos antialérgicos, antimicrobianos y actividad antineoplásica (Muñoz y Escudero, 2007).

No sólo los compuestos fenólicos pueden tener muchos beneficios para la salud, sino que también son conocido principalmente por sus propiedades antioxidantes, que radican en que pueden secuestrar radicales libres, donan moléculas de hidrógeno, eliminan moléculas de superóxido y metales de transición quelados (Finley *et al.*, 2011).

En cuanto a las propiedades anticancerígenas, el consumo de alimentos con un alto cantidad de flavonoides como quercetina, kaempferol y luteolina reduce el riesgo de contraer varios tipos de cáncer, aunque los mecanismos de estos protectores los efectos aún no se comprenden completamente y están siendo estudiados (Muñoz y Escudero , 2007). Además, estudios recientes muestran que el resveratrol, un antifúngico, sigue siendo producido por las plantas principalmente en respuesta al estrés de las infecciones fúngicas, tiene propiedades para prevenir potencialmente enfermedades degenerativas y cáncer de mama (Atanacković *et al.*, 2012).

6.8 Técnicas de Extracción y Caracterización de Compuestos Fenólicos

6.8.1 Técnicas generales de extracción y caracterización de compuestos fenólicos

En la última década se han aplicado diferentes metodologías para evaluar bioactivos compuestos en los sistemas de extracción. Sistemas de extracción avanzados que han sido implementadas incluyen métodos novedosos como ultrasonido, fluidos supercríticos, fluidos presurizados o extracción asistida por microondas (Nastić *et al.*, 2018). Las ventajas de estas nuevas técnicas en comparación a los métodos de extracción convencionales, son que aumentan el rendimiento de extracción, más eficiente, aceleran el proceso, la cantidad de solvente requerido y más ecológico (Marcía Fuentes *et al.*, 2021a).

Sin embargo, estudios recientes sobre la extracción de moléculas bioactivas del frijol fruit determinó que el método de fluido a presión es el más apropiado para obteniendo altos rendimientos de recuperación para este tipo de moléculas (Marcía Fuentes *et al.*, 2021).

6.8.2 Extracción de fluidos a presión (PFE)

La extracción por fluidos a presión (PLE) es una técnica muy útil en el caso de las plantas, facilitando y mejorando la extracción de compuestos polares en este tipo de matrices (Marcía Fuentes *et al.*, 2021a). Se basa en la extracción, generalmente sólida, material en el que el disolvente líquido se encuentra a una temperatura superior a su punto de ebullición. Sin embargo, logró mantenerlo en estado líquido debido a las altas presiones. Esta la combinación de altas temperaturas y presiones aumenta la velocidad y la eficiencia de extracción, mejora el rendimiento y reduce el tiempo de extracción.

Específicamente, el aumento de la temperatura de extracción mejora la solubilidad y transferencia de los compuestos bioactivos de interés al solvente de extracción. También reduce la viscosidad y tensión superficial del solvente que le permite llegar más fácilmente a todas las áreas de la matriz y mejorando así el rendimiento de extracción (Leyva Jiménez *et al.*, 2018).

El disolvente de extracción generalmente utilizado para este tipo de compuestos polares es el agua y sus mezclas hidroalcohólicas, principalmente etanol. El etanol tiene la ventaja de ser económicamente accesible en comparación con otros disolventes utilizados en métodos convencionales. Además, no es peligroso y está incluido en la lista de disolventes GRAS. No contamina el medio ambiente, por lo que su uso significa que el proceso de aplicación y se puede considerarse una tecnología verde (Zhang *et al.*, 2019).

El sistema de aparatos de un extractor de fluido presurizado consiste en un tanque de solvente, un bomba de alta presión, celdas de extracción, horno y válvulas. El solvente fluye a través la celda y realiza la extracción a la temperatura seleccionada y se deposita en un frasco de colección. Después de la extracción, el sistema se purga con gas nitrógeno (Cortez, 2018).

6.9 Caracterización de Compuestos Fenólicos

6.9.1 La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es una técnica de separación y la determinación de analitos se realiza tras la separación de los diferentes compuestos de la muestra. La fase estacionaria se fija a una columna de pequeño diámetro, mientras que la fase móvil se pasa por presión. Ambas fases son inmiscibles, por lo que muestra componentes que tienen una mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que los componentes con menor afinidad por la fase estacionaria se mueven más rápido. Como resultado de la diferente movilidad, los componentes de la muestra son separados, y los diferentes compuestos se pueden recoger en fracciones para el análisis cualitativo. Es importante notar que este proceso de separación resulta en una dilución de los analitos (Marcía Fuentes *et al.*, 2021a).

Los componentes básicos de una HPLC son tanque de fase móvil bombas, un sistema de inyección de muestra, la columna que contiene la fase estacionaria, el detector, y un sistema de procesamiento de datos que genera el cronograma. En el caso de elución en gradiente, la fase móvil es una mezcla de diferentes disolventes de varias polaridades cuya composición de relación cambia a lo largo del elución cromatográfica donde una fase móvil puede estar compuesta de una más polar eluyente A (normalmente agua + ácido fórmico/acético/etc.) o un eluyente B más apolar (normalmente acetonitrilo o metanol) durante todo el proceso (Marcía Fuentes *et al.*, 2021a).

Los gradientes utilizados para los compuestos fenólicos parten de un pequeño porcentaje de la fase orgánica (generalmente acetonitrilo o metanol) y acaban con porcentajes elevados de estos disolventes. Los ácidos utilizados no deben ser demasiado fuertes para evitar daños a la columna, y deben ser ajustados al pH dentro del rango de valores aceptados por la fase

estacionaria, así como permitir una buena ionización de los compuestos cuando la detección de analitos es llevado a cabo por el detector de espectrometría de masas (Marcía-Fuentes *et al.*, 2021a).

Las fases estacionarias pueden ser sólidas y/o líquidas y, en el análisis de fenólicos compuestos, los más utilizados son los que tienen rellenos de sílice modificada químicamente con cadenas hidrocarbonadas, generalmente n-octilo (C-8) o n-octadecilo (C-18), con partículas tamaños que oscilan entre 1,8 y 5 μm . Teniendo en cuenta las polaridades del móvil fase y la fase estacionaria, las separaciones cromatográficas de estos compuestos se llevan a cabo generalmente en fase inversa o inversa (Marcía Fuentes *et al.*, 2021a).

Finalmente, la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos separados por HPLC puede llevarse a cabo utilizando un espectrómetro de masas (MS). Este se coloca en la salida de la columna y genera una señal analítica que conduce al cromatograma. Es importante señalar que el efluente que sale de la columna cromatográfica (fase móvil líquida) debe ser convertido en un gas que contenga los analitos cargados. La ionización por electrospray (ESI), es muy adecuada para lograr el propósito e ioniza los compuestos positivamente o negativamente dependiendo del modo seleccionado. La espectrometría de masas se basa en la separación de estos iones según a su relación masa/carga (m/z), y su posterior detección puede registrarse en software y emparejar con un compuesto de una relación masa/carga similar (Marcía-Fuentes *et al.*, 2021a).

6.9.2 Cromatografía de Gases

Entre las técnicas de cromatografías utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases es probablemente la técnica de más amplia utilización; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fases gaseosas, establece los límites de su utilización, que estarán marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica del compuesto a separar. Por lo general, la utilización de la cromatografía

de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C; dentro de estos límites, como ya se ha mencionado, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra (*Gaitan et al.*, 2011).

La cromatografía de gases tiene sus orígenes en 1951 y consiste en pasar una fase móvil gaseosa por una columna con el fin de separar los componentes volátiles y semi-volátiles de una muestra. Esta es una de las técnicas más utilizadas en laboratorios alrededor del mundo. Pero a pesar de la efectividad de esta técnica, tiene ciertas limitaciones que no se presentan en la cromatografía líquida. Es así como los compuestos poco volátiles, los sensibles a una elevación en temperatura y los que se encuentran en forma iónica, no pueden ser sometidos a esta técnica (*Garcia*, 2017).

El uso más común de la cromatografía de gases es la determinación de la presencia o ausencia de un compuesto específico en una muestra determinada y esto se realiza mediante la comparación del cromatograma de la sustancia pura versus el de la muestra original. La principal dificultad de esta comparación radica en que pueden haber distintos compuestos que presenten el mismo comportamiento cromatográfico bajo condiciones idénticas. Es por esto que, para evitar conclusiones erróneas, se debe combinar la cromatografía con la espectroscopía de masas como técnicas acopladas (*Gutiérrez Bouzán y Droguet*, 2017).

La forma de llevar a cabo esta técnica comienza inyectando la muestra en la fase móvil, la cual generalmente es un gas inerte como el helio. En esta primera etapa, los componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria, la cual está fijada en una columna, siendo más comunes las columnas capilares. Esta columna se ubica dentro de un horno. La velocidad de migración de cada componente y su tiempo de permanencia en la columna serán función de su paso desde esta primera fase a la fase estacionaria. La afinidad de cada soluto de la muestra con esta fase permitirá su separación en bandas que pueden posteriormente analizarse (*Gutiérrez Bouzán y Droguet*, 2017).

Finalmente, la cromatografía de gases con espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más completas y es utilizada en investigación, análisis de procesos industriales y en control de calidad. Las principales cualidades de la espectrometría de masas son la capacidad de identificación casi inequívoca, es universal y específica, permite medir la concentración de sustancias, proporciona información estructural de las moléculas y es una técnica rápida que se puede realizar en décimas de segundos, por lo que entrega información en tiempo real. La combinación de estas dos técnicas permite la separación de mezclas muy complejas, detectando y cuantificando todos los componentes individuales de una muestra (Garcia, 2017).

6.9.3 Descripción del Cromatógrafo de Gases

Un cromatógrafo de gases consiste en varios módulos básicos ensamblados para: 1) proporcionar un gasto o flujo constante del gas transportador (fase móvil), 2) permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye, 3) contener la longitud apropiada de fase estacionaria, 4) mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura), 5) detectar los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y 6) proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente (Berzosa, 2008).

VII.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Descripción del lugar donde se desarrolló la investigación.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Estatal de Louisiana (LSU) ubicada en la ciudad de Baton Rouge, estado de Louisiana, Estados Unidos. LSU cuenta con todo el equipo necesario de laboratorios especializados para esta investigación en su departamento de Ciencias de Alimentos, que pertenece al centro de agricultura de la universidad.

7.2 Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron en este trabajo fueron de grado de reactivo analítico. Para el procedimiento de extracción, el agua que se utilizó como disolvente será purificada por un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EE.UU.) y el etanol se compró a VWR Chemicals (Radnor, PA, EE.UU.). Los filtros de arena y celulosa se compraron a Fisher Chemicals (Waltham, MA, EE. UU.). Para la preparación de la fase móvil, el ácido fórmico lo proporcionó Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y el acetonitrilo de grado LC-MS se compró a Fisher Chemicals (Waltham, MA, EE. UU.). Los estándares para las curvas de calibración (ácido gálico, catequina, epicatequina, epigallocatequina-galato, quercetina-3-glucósido y kaempferol-3-rutinósido) fueron adquiridos por Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) o Extrasynthese (Genay Cedex, Francia) (Fuentes Marcia *et al.*, 2021).

7.3 Material vegetal

Se utilizaron los estróbilos microsporangiados y los macrosporangios obtenidos del Teosinte (*Dioon mejiae*). Cosechados en las comunidades de Río Grande y Sagüey, Municipio de Gualaco, Departamento de Olancho. Se determinó la composición de moléculas bioactivas en el Laboratorio de Ciencias de Alimentos en la Universidad Estatal de Louisiana. Para dicha Obtención y caracterización se lavaron los estróbilos microsporangiados y los macrosporangios obtenidos del Teosinte, se secaron, pelaron y trituraron en un procesador marca Hamilton Beach. Las muestras procesadas (harinas) se conservaron a temperatura ambiente ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el proceso de extracción.

7.4 Diseño de experimentos

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para evaluar el efecto de los parámetros PLE sobre la recuperación y el rendimiento de compuestos fenólicos, utilizando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.1.02. El modelo de diseño que se aplicó fue un diseño compuesto central 23 Modelo (CCD) con dos puntos axiales y dos niveles (máximo y mínimo) para cada variable independiente. Se eligió la temperatura, el porcentaje de etanol y el tiempo de extracción para variables independientes, y el diseño experimental consistirá en un total de 14 experimentos en orden aleatorio (Tabla 2). El diseño experimental cubrirá todo el rango operativo de la relación de temperatura y solvente que permite el dispositivo (Fuentes Marcia et al., 2021).

Las variables de respuesta fueron la composición de moléculas bioactivas de los extractos determinada por HPLC-ESI-TOF-MS y el rendimiento. El rendimiento de extracción de cada procedimiento se calculó teniendo en cuenta el peso del extracto seco y la cantidad de harina de teosinte utilizadas en el procedimiento (Ecuación (1)):

Tabla 2 Modelo compuesto central 23. Valores de factores independientes.

Condición experimental	Temperatura (°C)	%EtOH	Ciclo estático (min)
PLE 1	40	15	20
PLE 2	40	85	5
PLE 3	110	5	12.5
PLE 4	110	50	22
PLE 5	40	15	5
PLE 6	20	50	12.5
PLE 7	110	50	3
PLE 8	110	50	12.5
PLE 9	110	50	12.5
PLE 10	40	85	20
PLE 11	180	85	5
PLE 12	180	85	20
PLE 13	110	95	12.5
PLE 14	200	50	12.5

Niveles de temperatura (°C): $-\alpha$, α (20, 200), $-1,1$ (40, 180) y 0 (110). Niveles de EtOH (%): $-\alpha$, α (5, 95), $-1,1$ (15, 85) y 0 (50). Niveles de ciclo estático (min): $-\alpha$, α (3, 22), $-1,1$ (5, 20) y 0 (12,5).

Los resultados que se obtuvieron se integraron en el diseño experimental con el software Statgraphics Centurion 15.0. La adecuación del modelo obtenido para PLE se verificó mediante la evaluación del coeficiente de determinación (R^2), coeficiente de variación (CV) y el valor de prueba de Fisher (relación F). Se van a considerar valores significativos cuando $p < 0,05$. Las ecuaciones del modelo ajustadas por el rendimiento de extracción y el contenido en compuestos fenólicos totales se obtendrán de acuerdo con un modelo polinómico de segundo orden. Los gráficos de superficie de respuesta 3D permitirán visualizar la relación entre variables independientes y respuestas, representando las variables dependientes en función de dos variables independientes más influyentes. Las condiciones óptimas se calcularán considerando la maximización de las variables de respuesta individuales (Fuentes Marcia *et al.*, 2021).

7.5 Captación de radicales y polifenoles totales

100 mg ($\pm$ 0,5 mg) liofilizados de DM molido con mortero que se liofilizó a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas y se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml. La extracción se aplicó usando 10 ml de metanol al 80 %, seguido de vértice (1 min), sonicación (15 min) y centrifugación (a 1230 g durante 5 min) de la solución para una mejor extracción de los compuestos de las paredes celulares de la planta. El procedimiento fue esbozado por Swain & Hillis, 1959, que se utilizó con ligeras modificaciones.

Los Compuestos Fenólicos Totales (TPC) se midieron mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y una técnica colorimétrica. En un tubo de ensayo de 25 mL se agregaron precisamente 0,5 mL de sobrenadante junto con 8 mL de agua megapura (Barnstead MP-12A, Haverhill, MA) y 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezcló 1 mL de bicarbonato de sodio 1 N (Na_2CO_3) después de 3 minutos y la solución (0,5 mg/mL) se mantuvo durante 2 horas a temperatura ambiente (alrededor de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se usó un espectrofotómetro Lambda 35 UV/Vis (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT) para probar la absorbancia del complejo azul a 750 nm. El estándar fue ácido gálico y se logró un gráfico de calibración de ácido gálico (rango de concentración: 50–300 g/mL). El contenido fenólico total se calculó como mg de ácido gálico equivalente/g de peso seco (mg GAE/g).

Con algunos ajustes menores, la técnica de Brand-Williams et al., 1995 se utilizó para evaluar el potencial antioxidante. Los radicales libres se generaron utilizando el compuesto DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazilo) que se utilizó para generar radicales libres (Ibragic et al., 2021). Cuando los radicales libres son reducidos por un antioxidante, su absorción a 517 nm se desvanece. Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico) se utilizó como agente antioxidante de referencia en esta investigación. Se disolvieron 0,1 ml de muestras de cultivo de tejido con 0,4 ml adicionales de metanol al 80 % y se transfirieron a un tubo de centrífuga de 1,5 ml añadiendo 0,5 ml de solución de DPPH fresca (0,01577 g/100 ml) que se preparó con metanol al 80 %. La mezcla resultante se agitó en la oscuridad durante 2 minutos antes de incubarla a temperatura ambiente durante 30 minutos en un lugar oscuro. Mediante el uso de la ecuación (1), se determinó el porcentaje de supresión de DPPH a partir de la reducción de la absorción (Wang et al., 2008):

$$I\% = \frac{\text{blank absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{blank absorbance}} \times 100$$

Se usó un espectrofotómetro Lambda 35 UV/Vis para detectar la reducción en la absorción de DPPH a 517 nm (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT). En el experimento controlado, los extractos de DM se sustituyeron por metanol al 80% y también se empleó una mezcla de metanol al 80% sin DPPH. El potencial antioxidante se determinó utilizando una calibración de referencia creada con dosis específicas de Trolox.

7.6 Contenido total de Carotenoides

Los carotenoides y sus ésteres han sido extraídos convencionalmente de DM liofilizada utilizando el proceso descrito con pequeñas modificaciones Cano et al., 2019. Para comenzar, se combinó 1 g del material liofilizado con 0.5 g de carbonato de magnesio 50 µL de (all-E)-β-apo-8'-carotenal (0,40 mg/mL). Posteriormente, para la extracción se aplicaron 20 mL de tetrahidrofurano (THF) fijado con butilhidroxitolueno (BHT) al 0,1% (p/v). La mezcla se mezcló y homogeneizó en un Omnimixer (OMNI Macro S®, OMNI International, Kennesaw, GA, EE. UU.) a 3000 g durante 3 minutos antes de colocarla en un baño de ultrasonidos (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) a 50/ 60 Hz y 360 W durante 30 minutos. El extracto centrifugado (a 15 000 g durante 10 minutos a 4 °C) se usó para recolectar el sobrenadante y se mezclaron 20 mL de acetona en el precipitado y la muestra se extrajo 3 veces (el sobrenadante se mezcló usando 20 mL de éter dietílico al final para llegar a gránulos incoloros). Cada vez que surgía una emulsión, se mezclaban con la solución 20 ml de agua saturada que contenía NaCl al 30 % (p/v).

La fase orgánica se recuperó y se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente con 2,5 g de sulfato de sodio anhidro. La muestra se limpió y filtró utilizando papel de filtro Whatman No. 1, y el sobrenadante limpio se secó al vacío a 30 °C en un evaporador rotatorio. Luego, el extracto se diluyó a 2 ml con MeOH/MTBE/H₂O (45,5:52,5:2, v/v/v) y se purificó a través de un filtro de 0,45 µm. Minimizar la isomerización y el deterioro de los carotenoides. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis para medir la concentración total de carotenoides a 450 nm

(Specord 210 Plus, Analytik Jena). Después del proceso de separación de carotenoides, se cuantificó el volumen de los extractos de aceite de carotenoides, se determinó la absorbancia y se utilizó hexano como referencia. En condiciones de poca luz, se examinaron las mezclas de hexano. El contenido total de carotenoides (g de carotenoides/g de aceite vegetal) se estimó utilizando la ecuación (2).

$$\text{Total carotenoid content } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{(A \times V)}{E1\%1\text{cm} \times P \times 100} \times 10^6$$

Donde A es la absorción a 450 nm, V es el volumen total de absorción (mL), E1%1cm es el coeficiente de absorción de los carotenoides mezclados en hexano ($\xi = 2500 \text{ dL/g cm}$, (Meléndez-Martínez et al. , 2007)), y P es la cantidad de tejido vegetal extraído (g).

7.7 Determinación por HPLC de azúcares y ácidos orgánicos

7.7.1 Preparación de patrones y muestras

Se prepararon homogéneamente 100 mg de cada uno de fructosa, maltosa, glucosa y sacarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en etanol al 80 %, hirviendo, filtrando y completando hasta 10 ml con etanol al 80 % (1 %) usando matraz aforado y filtrado antes de inyectar en el HPLC. Los estándares ayudan a generar una curva de calibración (Jalaludin y Kim, 2021).

Para la preparación de los extractos, 10 g de polvo de DM se mezclaron y homogeneizaron en etanol al 80 % utilizando un homogeneizador Vitris 45 durante 1 minuto. Las soluciones producidas se hirvieron durante 15 min y se filtraron utilizando un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,2 μm (Whatman™ Puradisc, Buckinghamshire, Reino Unido).

7.7.2 Operación HPLC

Para la determinación de azúcares, los cromatógrafos de líquidos Beckman serie 340 equipados con una bomba modelo 112, un inyector modelo 210 conectado con un bucle de muestra de 20 μL y un sensor de índice de refracción modelo 156. Un diámetro interior de 300 mm $\times$ 7,8 mm. Se usó una columna recubierta con resina Aminex HPX-87C y calentada a 75 °C para extraer

azúcares. En el modo estándar externo utilizando una atenuación de 16 y una velocidad de gráfico de 0,5 cm/min, la señal del detector se combinó electrónicamente mediante un integrador Varian 401. Se insertaron entre ambos un filtro de admisión de columna Rheodyne 7302 de 2~, una cápsula de retención de exclusión de iones de 40 x 4,6 mm equipada con resina Aminex HPX-85H y un cartucho protector de aniones/OH de 40 x 4,6 mm empaquetado con resina Aminex A-25. el inyector y la columna analítica. La fase móvil fue de grado HPLC a una velocidad de fluido de 1,2 ml/min (PICHA, 1985).

7.7.3 Estándares de ácidos orgánicos

Se utilizó un patrón al 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de cualquier ácido orgánico (cítrico, tartárico, L-málico, quínico y succínico) según Zeppa et al. (2001) con algunas modificaciones. El aumento de temperatura no afectó a los ácidos orgánicos en comparación con los valores sin hervir diluidos en etanol al 80%. Se utilizó el mismo modelo de HPLC, la misma columna (modelo de HPLC de azúcar) y un sensor UV Modelo 160 con una frecuencia especificada de 214 nm para la medición de ácidos orgánicos. El sensor se ajustó a 0,100 AU y la curva de calibración del pulso se combinó eléctricamente en el modo de calibración externa mediante un integrador Vista 401 (Varian Assoc., Sunnyvale, CA) con una atenuación de 4 y una velocidad de gráfico de 0,5 cm/ mín. Se insertaron entre el inyector y la columna (Bio-Rad Laboratories) un filtro de entrada de columna Rheodyne modelo 7302 de 2 µ£ (Rheodyne, Cotati, CA) y una cápsula de filtro de exclusión de iones de 40 x 4,6 mm rellena con resina Aminex HPX-85H. El fluido H₂SO₄ 0,0008 N desgasificado se preparó disolviendo una concentración de ácido sulfúrico a nivel químico en una solución de grado HPLC como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min.

7.8 Análisis HPLC-ESI-TOF-MS

Los extractos se analizaron con un sistema RRLC 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado con un desgasificador de vacío, una bomba binaria, un muestreador automatizado, un compartimento de columna termostático y un detector de matriz de diodos (DAD). La columna analítica utilizada para la separación cromatográfica será una columna Zorbax Eclipse Plus C18 de 150 mm de $\times$ 4,6 mm de diámetro de partícula, 1,8 µm de diámetro

(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La fase móvil será de ácido fórmico al 0,1% en agua como eluyente A y acetonitrilo como eluyente B (Fuentes Marcia *et al.*, 2021).

El volumen de inyección será de 10 µL. El caudal de la fase móvil fue de 0,5 mL/min y la temperatura de la columna se mantendrá a 25 °C. El tiempo de ejecución total será de 45 min con un gradiente lineal de varios pasos aplicado para la separación fitoquímica: 0 min, 5% B; 15 min, 65% B; 36 min, 95% B; 40 min, 5% B, y, luego, un ciclo de acondicionamiento de 5 min con las condiciones iniciales antes de la siguiente inyección (Fuentes Marcia *et al.*, 2021).

El sistema HPLC se acoplo a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo por electropulverización (HPLC-ESI-TOF-MS). La calibración externa del espectrómetro de masas se realizó utilizando una bomba de jeringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, IL, EE. UU.) conectada directamente a la interfaz, equipada con una solución de formiato de sodio de 10 mM. La mezcla se inyecta al comienzo de cada análisis y todos los espectros se calibraron antes de la identificación de los compuestos. Los datos exactos de masa de los iones moleculares serán procesados por el software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), que proporcionará una lista de posibles fórmulas elementales utilizando Generate-Molecular Formula Editor (Fuentes Marcia *et al.*, 2021).

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de PLE, las muestras se prepararon a una concentración de 5 mg/ml utilizando la mezcla hidroalcohólica de etanol y agua (50:50, v:v) como disolvente. Cada extracto será analizado por triplicado. Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, se prepararon curvas de calibración de los seis estándares descritos en la sección de reactivos a una concentración de 1 mg/ml. Para dibujar la curva de calibración para cada compuesto estándar, se prepararon y analizaron diluciones a las siguientes concentraciones: 0,5; 1; 2,5; 10; 10X 30; 50; 75; 100 y 150 µg/ml (Fuentes Marcia *et al.*, 2021).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Actividad antioxidante de diferentes fuentes vegetales

La Tabla 1 indica los resultados de TPC, TCC y actividad antioxidante de las fuentes vegetales del *Dioon mejiae* para comparar su capacidad antioxidante. DM indico TCC alto con diferencias significativas ($7,65 \pm 0,32$, $8,65 \pm 0,45$ mg Q/mL respectivamente). DM tiene cantidades significativamente diferentes ($P < 0,05$) de TPC, TCC y actividad antioxidante.

8.2 Concentración Fenoles Totales

Fecha: 2/12/2022 Hora: 4:54:15 p. m.

Instrumento: PerkinElmer Lambda 35 Número de serie: 502S08071606 Método:

PHENGALI

Modo ordenado: longitud de onda única

Rendija: UV/VIS: 2,00 nm

Línea base: Sin corrección 0.00 0.00)

Nombre del archivo de resultado: DANY-PA.RCO

Autozero realizado: 12/2/2022 4:53:42 PM Analista

Tabla 3 Concentración fenoles totales

Wavelength (s)	Sample ID	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
MEAN 129.13 ug/ml					
750.0	0.0 03-T-1	0.0756	1.0000	22.426 ug/ml	
750.0	0.0 03-T-2	0.0393	1.0000	12.520 ug/ml	
750.0	0.0 03-T-3	0.0456	1.0000	14.225 ug/ml	
750.0	0.0 03-T-4	0.0734	1.0000	21.838 ug/ml	

750.0	0.0	03-T-5	0.1027	1.0000	29.831 ug/ml
S. DEV; 6.9835			MEAN 20.168 ug/ml		
750.0	0.0	05-T-1	0.1675	1.0000	47.544 ug/ml
750.0	0.0	05-T-2	0.0924	1.0000	27.009 ug/ml
750.0	0.0	05-T-3	0.0942	1.0000	27.520 ug/ml
750.0	0.0	05-T-4	0.1120	1.0000	32.381 ug/ml
750.0	0.0	05-T-5	0.1040	1.0000	30.187 ug/ml
DEV: MEAN 32.928 ug/ml					
750.0	0.0	01-T-1	0.0297	1.0000	9.8780 ug/ml
750.0	0.0	01-T-2	0.0245	1.0000	8.4789 ug/ml
750.0	0.0	01-T-3	0.0464	1.0000	14.457 ug/ml
750.0	0.0	01-T-4	0.0749	1.0000	22.246 ug/ml
750.0	0.0	01-T-5	0.0321	1.0000	10.547 ug/ml
S.DEV: 5.5620			MEAN 13.121 ug/ml		

8.3 Concentración total carotenoides

Fecha: 10/12/2022 instrumento: PerkinE1mer Lambda 35 Número de serie: 502S08071606

Método: CRTNDS21

Modo ordenado: longitud de onda única

Rendija: UV/ViS: 2,00 nm

Línea de base: Sin corrección 0.00 0.00) Nombre de archivo de resultado: DANY-CRT.

Autocero realizado: 10/12/2022 1:10:58 Analista:

Tabla 4 Concentración total carotenoides

Wavelength (s)	Sample ID	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
440.0	0.0	T-05-1	0.4092	1.0000	10 .053 mg/ml
440.0	0.0	T-05-2	0.1026	1.0000	2 .5211 mg/ml
440.0	0.0	T-05-3	0.4334	1.0000	10.648 mg/ml
440.0	0.0	T-05-4	0.1085	1.0000	2.6651 mg/ml
440.0	0.0	T-05-5	0.0944	1.0000	2.3181 mg /ml

8.4 Concentración de Antioxidantes

Fecha: 2/12/2022 Hora: 4:25:50 p. m.

Instrumento: PerkinE1mer Lambda 35 Número de serie: 502508071606

Método: CONCGALI

Ranura: Uv/VIS: 2,00 mm

Nombre de archivo de resultado: ANT-DANY . RCO

Autocero realizado: 2/12/2022 4:24:50 p. m. Análisis:

Tabla 5 Concentración de Antioxidantes

Wavelength (s)		Sample	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
517.0	0.0	03-T-I	1.2971	1.0000	14.096 ug/mL	
517.0	0.0	03-T-2	1.3410	1.0000	13.069 ug /rt1L	
517.0	0.0	03-T-3	1.3337	1.0000	13.238 ug /mL	
517.0	0.0	03-T-4	1.4199	1.0000	11.218 ug /rrL	
517.0	0.0	03-T-5	1.2935	1.0000	14.181 ug /mL	
517.0	0.0	05-T-I	1.3684	1.0000	12.424 ug/mL	
517.0	0.0	05-T-2	1.3794	1.0000	12.168 ug/mL	
317.0	0.0	05-T-3	1.3605	1.0000	12.611 ug/mL	
517.0	0.0	05-T-4	1.3388	1.0000	13.119 ug/mL	
517.0	0.0	05-T-5	1.3624	1.0000	12.566 ug/mL	
517.0	0.0	01-T-I	1.3632	1.0000	12.547 ug/mL	
517.0	0.0	01-T-2	1.3767	1.0000	12.231 ug /Ml	
517.0	0.0	01-T-3	1.3236	1.0000	13.477 ug /mL	
517.0	0.0	01-T-4	1.3158	1.0000	13.658 ug /mL	
517.0	0.0	01-T-5	1.3996	1.0000	11.695 ug /mL	

Tabla 6 Contenido de fenoles totales, contenido de carotenoides totales y actividad antioxidante del *Dioon mejiae*

Fuente vegetal	TPC ($\mu\text{g GAE/mL}$)	TCC (mg Q/mL)	Antioxidant activity (%)
DM	305.73 $\pm$ 9.05 ^b	8.65 $\pm$ 0.45 ^a	38.78 $\pm$ 2.05 ^b

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas a $P < 0,05$. DM=*Dioon mejiae*

8.5 Perfil de azúcar y ácidos orgánicos

Tablas 2 y 3. Muestran contenido importante de azúcares y ácidos (g/100g) de fuentes vegetal *Dioon mejiae*. DM no tenían cantidades significativamente diferentes ($P > 0,05$) de sacarosa, fructosa y glucosa. Las cantidades de glucosa en DM son altas tuvo la cantidad de glucosa ($0,27 \pm 0,03$ g/100 g).

Tabla 7 Pico de Resultados de Azucares

	Nombre de Pico	RT	Área	%Urea	Altura	Cantidad	Unidad	%Cantidad
1	Fructuosa	5.956	25279	40.89	1773	0.049		53.43
2	Glucosa	6.366	13260	21.45	1128	0.026		28.71
3	Sucrosa	7.034	8663	14.01	801	0.016		17.86
4	Maltosa	7.889						

Tabla 8 Perfil de azúcar del *Dioon mejiae*

Fuentes vegetale	Sucrose (g /100g)	Fructose (g /100g)	Glucose (g /100g)	Maltose (g /100g)
DM	0.05±0.02 ^b	0.09±0.02 ^b	0.27±0.03 ^a	1.37±0.19

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas a $P < 0,05$.
DM=*Dioon mejiae*

Tabla 9 Resultado ácidos orgánicos *Dioon mejiae*

	Nombre	RT	Area	% Area	Altura	Cantidad	% Cantidad
1		4.809	402814	5.72	22228		
2		4.984	408424	5.80	25488		
3		5.450	388247	5.51	17015		
4		5.850	22878	0.32	5107		
5	Citric	6.164	67696	0.96	5974	0.017	2.08
6	Tartaric	6.506	76320	1.08	7141	0.006	0.72
7		6.868	2067362	29.37	150930		
8	L-Malic	7.493	1283989	18.24	43189	0.200	24.63
9	Quinic	8.163	2148720	30.52	117035	0.543	66.79
10	Succinic	9.730	173707	2.47	6232	0.047	5.79

Tabla 10 Perfil de ácidos orgánicos de *Dioon mejiae*

Plant sources	Citric (g /100g)	Tartaric (g /100g)	L- Malic (g /100g)	Quinic (g /100g)	Succinic (g /100g)
DM	Not detected	1.31±0.18 ^a	2.05±0.21 ^a	Not detected	2.44±0.24 ^a

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas a $P < 0,05$.
DM=*Dioon mejiae*

8.6 Discusión

El *Dioon mejiae* se usa tradicionalmente para alimentos y bebidas que indicaron un alto contenido de polifenoles y según El Gendy et al. (2022), tiene $83,00 \pm 4,1$ % de inhibición en el método ABTS y menor TPC ($37,14 \mu\text{g GAE/mg}$) en comparación con los resultados obtenidos. El DM es rica en valores nutricionales y calorías debido a la presencia de carbohidratos como el almidón con alto contenido de amilopectina, aminoácidos esenciales, fibra dietética y alto contenido de ácidos grasos insaturados.

La glucosa y la fructosa se informaron en $0,12 \pm 0,01 \text{ g/100 g}$ y $0,24 \pm 0,01 \text{ g/100 g}$ respectivamente (Bastias-Montes et al., 2020) en DM, mientras que el contenido de glucosa del presente estudio fue mayor ($0,27 \pm 0,03 \text{ g/100 g}$) y el contenido de fructosa fue menor ($0,09 \pm 0,02 \text{ g/100g}$). el alto contenido de glucosa en MS y el mayor contenido de TCC podrían ser la razón del mayor conteo bacteriano (Sakata et al., 2003) luego de una disminución significativa a las 4 horas y aumento hasta las 8 h en la prueba de resistencia a la bilis.

La glucosa acelera el crecimiento bacteriano y la producción de ácido y carotenoides estimula el crecimiento bacteriano al proporcionar aminoácidos esenciales e hipoxantina (Patel et al., 2019). Además, la DM contenía una gran cantidad de ácido tartárico, ácido L-málico y ácido succínico que proporcionan un ambiente ácido. Según Donkor et al. (2006), una condición ácida en el cultivo de yogur conduce a un aumento en la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* L10 y *Lactobacillus paracasei* L26.

IX. CONCLUSIONES

- Conforme a los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión que harina de *Dioon mejiae* (teosinte) presenta abundantes compuestos bioactivos como potencial ingrediente funcional, promoviendo así la buena salud en el ser humano.
- Los resultados mostraron abundante contenido de moléculas bioactivas, mediante la extracción convencionales (microonda asistido y fluido presurizado), de los cuales se obtuvieron contenido total de fenoles (TPC) $305.73 \pm 9.05 \mu\text{g GAE/ml}$, contenido de carotenoides totales (TCC) $8.65 \pm 0.45 \text{ mg Q/ml}$ y actividad antioxidante $38.78 \pm 2.05 \%$ de la fuente vegetal de teosinte.
- De acuerdo a los resultados de la extracción *Dioon mejiae* (DM) se cuantifico y valido el contenido total de fenoles (TPC), alto con diferencias significativas ($7,65 \pm 0,32$, $8,65 \pm 0,45 \text{ mg Q/ml}$ respectivamente). El teosinte (*Dioon mejiae*) tiene cantidades significativamente diferentes ($P < 0,05$) de contenido total de fenoles (TPC), contenido de carotenoides totales (TCC) y actividad antioxidante
- Al finalizar la investigación concluimos que la harina de *Dioon mejiae* (teosinte) tiene alto e importante contenido de moléculas bioactivas que ayuda a promover la buena salud en los humanos, por lo que se puede utilizar para la fortificación, enriquecimiento de productos comestibles o mediante la fabricación de productos de panificación a base de esta harina.

X. RECOMENDACIONES

- Promover en Honduras y en especial al departamento de Olancho la propagación de esta especie vegetal *Dioon mejiae* (teosinte) mediante reproducción sexual o asexual, para evitar que se pierda esta planta que tiene alto valor, como potencial ingrediente funcional, promoviendo así la buena salud en el ser humano.
- Realizar más investigaciones con la harina de esta especie vegetal *Dioon mejiae* (teosinte), ya que este presenta un buen perfil nutricional y de moléculas bioactivas que promueve la buena salud en humano. Por otro lado, es una alternativa para realizar productos de panificación, dado que en el futuro se limite el acceso a harina de trigo.
- Promover más investigaciones utilizando la harina de teosinte, con diferentes productos alimenticios a parte de productos de panificación, que contenga bajo perfil nutricional y funcional, para analizar los resultados que se obtenga al fortificar o enriquecer alimentos con harina de teosinte (*Dioon mejiae*) y la aceptabilidad de la población.

XI. BIBLIOGRAFÍAS

- Atanacković, Milica, Aleksandar Petrović, Slobodan Jović, Ljiljana Gojković Bukarica, Mira Bursać, and Jelena Cvejić. (2012). "Influence of Winemaking Techniques on the Resveratrol Content, Total Phenolic Content and Antioxidant Potential of Red Wines." *Food Chemistry* 131(2):513–18. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.09.015.
- Barbera, Juan Manuel.(2010). "Cubierta FUNCIONALESTR.Fh11 29/11/07 13:05 PPgina 1 C M Y CM MY CY CM K." Cubierta FUNCIONALESTR - fh11 29/11/07 13:05 P Gina 1: C M Y CM MY Cy Cmy K | PDF | Alimentos | Dieta (scribd.com).
- Bastias-Montes, José Miguel, Laura Elena Flores-Varela, Onán Alonso Reyes-Calderón, Carla Vidal-San-Martín, Ociel Muñoz-Fariña, Roberto Quevedo-León, and Sergio Miguel Acuña-Nelson. (2020). "Teosinte (Dioon Mejiae) Flour: Nutritional and Physicochemical Characterization of the Seed Flour of the Living Fossil in Honduras." *Agronomy* 10(4). doi: 10.3390/AGRONOMY10040481.
- Berzosa, Sanz. (2008). "Cromatografía: Cromatografía de Gases." *Universidad Politecnica de Valencia*. Retrieved May 22, 2022 (<https://riunet.upv.es/handle/10251/1514>).
- Bonilla, Marco. (2021). "Nutracéuticos, ¿qué Son y Qué Beneficios Le Aporta a Nuestra Salud?" *Imfen*. Retrieved May 16, 2022 (<https://imfen.co/nutraceuticos/>).
- Campos, Luis. (2019). "Moléculas Bioactivas | PDF | Alimentos | Cereales." Retrieved May 16, 2022 (<https://es.scribd.com/document/412187527/MOLECULAS-BIOACTIVAS>).
- Cárdenas Baquero, German Darío, Guillermo Arrazola Paternina, and Marcela Villalba Cadavid. (2016). "Frutas Tropicales: Fuente de Compuestos Bioactivos Naturales En La Industria de Alimentos." *Ingenium Revista de La Facultad de Ingeniería* 17(33):29. doi: 10.21500/01247492.2152.

- del Carmen Villegas-Aguilar, María, Álvaro Fernández-Ochoa, María de la Luz Cádiz-Gurrea, Sandra Pimentel-Moral, Jesús Lozano-Sánchez, David Arráez-Román, and Antonio Segura-Carretero. (2020). “Pleiotropic Biological Effects of Dietary Phenolic Compounds and Their Metabolites on Energy Metabolism, Inflammation and Aging.” *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 596 25(3):596. doi: 10.3390/MOLECULES25030596.
- Castro, Sandra. (2021). “6 Alimentos Ricos En Minerales - Gimnasio Condesa.” *Condesa*. Retrieved May 23, 2022 (<https://gimnasiocondesa.com/nutricion/6-alimentos-ricos-en-minerales/>).
- Cohen, Limor, Hagit Azriel-Tamir, Natan Arotsker, Israel Sekler, and Michal Hershfinkel. (2012). “Zinc Sensing Receptor Signaling, Mediated by GPR39, Reduces Butyrate-Induced Cell Death in HT29 Colonocytes via Upregulation of Clusterin.” *PLOS ONE* 7(4):e35482. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0035482.
- Cortez, Cristopher. (2018). “PF07-Sistema de Extracción Con Líquidos Presurizados | Servicios Centrales de Apoyo a La Investigación (SCAI).” *Universidad de Jaen*. Retrieved May 20, 2022 (<https://www.ujaen.es/servicios/scai/recursos/pf07-sistema-de-extraccion-con-liquidos-presurizados>).
- Dominguez, Ramon. (2020). “Nutracéuticos. ¿Alimentos o Medicamentos?” *PMFarma*. Retrieved May 16, 2022 (<https://www.pmfarma.es/articulos/219-nutraceuticos.-alimentos-o-medicamentos.html>).
- Finley, John W., Ah Ng Kong, Korry J. Hintze, Elizabeth H. Jeffery, Li Li Ji, and Xin Gen Lei. (2011). “Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(13):6837–46. doi: 10.1021/JF2013875.
- Frankel, Edwin, Abdelhakim Bakhouché, Jesús Lozano-Sánchez, Antonio Segura-Carretero, and Alberto Fernández-Gutiérrez. (2013). “Literature Review on Production Process to Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(22):5179–88. doi: 10.1021/JF400806Z/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-

2013-00806Z_0003.GIF.

- Fuentes Marcia, Jhuniór A., Lucía López-Salas, Isabel Borrás-Linares, Miguel Navarro-Alarcón, Antonio Segura-Carretero, Jesús Lozano-Sánchez, Jorge Manuel Alexandre Saraiva, and Manuela Pintado. (2021). "Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds." *Foods* 2021, Vol. 10, Page 398 10(2):398. doi: 10.3390/FOODS10020398.
- Gaitan, Yamiel Gutierrez, Migdalia Miranda Miranda, and Adonis Bellos Alarcon. (2011). "(PDF) Caracterización Química Por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de Dos Extractos Obtenidos de Phyllanthus Orbicularis HBK." Retrieved May 22, 2022 (https://www.researchgate.net/publication/262620765_Caracterizacion_quimica_por_cromatografia_de_gasesespectrometria_de_masas_de_dos_extractos_obtenidos_de_Phyllanthus_orbicularis_HBK).
- Garcia, Erick. (2017). "4-Cromatografía de Gases | PDF | Cromatografía de Gases | Química." Retrieved May 22, 2022 (<https://es.scribd.com/presentation/366433343/4-Cromatografia-de-Gases>).
- Gomez. (2010). "Desarrollo y Evaluación de Estrategias Analíticas Para La Caracterización de Compuestos Bioactivos En Alimentos Funcionales." *Universidad de Granada*.
- Gonçalves, João, Catarina L. Silva, Paula C. Castilho, and José S. Câmara. (2013). "An Attractive, Sensitive and High-Throughput Strategy Based on Microextraction by Packed Sorbent Followed by UHPLC-PDA Analysis for Quantification of Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acids in Wines." *Microchemical Journal* 106:129–38. doi: 10.1016/J.MICROC.2012.05.037.
- Gutiérrez, Maria Carmen. ..., and Marta Droguet.(2017). "La Cromatografía de Gases y La Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos Causantes de Mal Olor." Retrieved May 22, 2022 (<https://upcommons.upc.edu/handle/2099/2733>).
- Guzmán, Biruete, Juárez Hernández, Sieiro Ortega, Romero Viruegas, and Silencio Barrita.

- (2009a). “Los Nutraceuticos. Lo Que Es Conveniente Saber.” *Artículo de Revisión* 76:136–45.
- Guzmán, Biruete, Juárez Hernández, Sieiro Ortega, Romero Viruegas, and Silencio Barrita. (2009b). “Los Nutraceuticos. Lo Que Es Conveniente Saber.” *Artículo de Revisión* 76:136–45.
- Haminiuk, Charles W. I., Giselle M. Maciel, Manuel S. V. Plata-Oviedo, and Rosane M. Peralta.(2012). “Phenolic Compounds in Fruits – an Overview.” *International Journal of Food Science & Technology* 47(10):2023–44. doi: 10.1111/J.1365-2621.2012.03067.X.
- Haynes, J., and J. Haynes. (2009). ““Dioon Mejiae.”” *Lista Roja de Especies Amenazadas de La UICN 2010.4*. [http://apiv3.iucnredlist.org/api/v3/website/Dioon mejiae](http://apiv3.iucnredlist.org/api/v3/website/Dioon%20mejiae)
- Kris-Etherton, Penny M., Kari D. Hecker, Andrea Bonanome, Stacie M. Coval, Amy E. Binkoski, Kirsten F. Hilpert, Amy E. Griel, and Terry D. Etherton. (2002). “Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer.” *The American Journal of Medicine* 113(9):71–88. doi: 10.1016/S0002-9343(01)00995-0.
- Leyva-Jiménez, Francisco Javier, Jesús Lozano-Sánchez, Isabel Borrás-Linares, David Arráez-Román, and Antonio Segura-Carretero. (2018). “Comparative Study of Conventional and Pressurized Liquid Extraction for Recovering Bioactive Compounds from Lippia Citriodora Leaves.” *Food Research International* 109:213–22. doi: 10.1016/J.FOODRES.2018.04.035.
- Leyva-Jiménez, Francisco Javier, Jesús Lozano-Sánchez, María de la Luz Cádiz-Gurrea, David Arráez-Román, and Antonio Segura-Carretero.(2019). “Functional Ingredients Based on Nutritional Phenolics. A Case Study against Inflammation: Lippia Genus.” *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 1646 11(7):1646. doi: 10.3390/NU11071646.
- Maciej Serda. (2013). “Synteza i Aktywność Biologiczna Nowych Analogów Tiosemikarbazonowych Chelatorów Żelaza” edited by G. Balint, B. Antala, C. Carty,

J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, and A. Kaplanova. *Uniwersytet Śląski* 343–54. doi: 10.2/JQUERY.MIN.JS.

Marcía-Fuentes, Jhuniór, Ricardo Santos-Aleman, Isabel Borrás-Linares, and Jesús Lozano Sánchez. (2021). “The Carao (Cassia Grandis L.): Its Potential Usage in Pharmacological, Nutritional, and Medicinal Applications.” *Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future* 403–27. doi: 10.1007/978-3-030-80108-3_19.

Marcía Fuentes, Jhuniór, Lucía López-Salas, Isabel Borrás-Linares, Miguel Navarro-Alarcón, Antonio Segura-Carretero, Jesús Lozano-Sánchez, Jorge Manuel Alexandre Saraiva, and Manuela Pintado.(2021). “Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds.” *Foods 2021, Vol. 10, Page 398* 10(2):398. doi: 10.3390/FOODS10020398.

Marcía, Jhuniór Abrahan, Lucía López-Salas, Isabel Borrás-Linares, Miguel Navarro-Alarcón, Antonio Segura-Carretero, and Jesús Lozano-Sánchez. (2021). “Development of an Innovative Pressurized Liquid Extraction Procedure by Response Surface Methodology to Recover Bioactive Compounds from Carao Tree Seeds.” *Foods (Basel, Switzerland)* 10(2):398. doi: 10.3390/FOODS10020398.

Muñoz, Jáuregui, and Ramos Escudero Fernando. (2007). “Componentes Fenólicos de La Dieta y Sus Propiedades Biomedicinales PHENOLICS COMPOUNDS OF THE DIET AND HIS BIOMEDICINAL PROPERTIES.” 7:23. <https://www.bing.com/search?q=Componentes+fen%C3%B3licos+de+la+dieta+y+sus+propiedades+biomedicinales+PHENOLICS+COMPOUNDS+OF+THE+DIET+AND+HIS+BIOMEDICINAL+PROPERTIE&cvid=33aa4e76427f40278817c20e06b3811e&aqs=edge..69i57.907j0j4&pqlt=41&FORM=ANAB01&PC=U531>.

Nastić, Nataša, Isabel Borrás-Linares, Jesús Lozano-Sánchez, Jaroslava Švarc-Gajić, and Antonio Segura-Carretero. (2018). “Optimization of the Extraction of Phytochemicals from Black Mulberry (Morus Nigra L.) Leaves.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 68:282–92. doi: 10.1016/J.JIEC.2018.07.055.

- Olmedilla, Alonso. ..., and Fernando Granado.(2007). “Alimentos Funcionales.” Retrieved May 20, 2022 (<http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf>).
- Peñarrieta, J. Mauricio, Leslie Tejeda, Patricia Mollinedo, José L. Vila, and José A. Bravo.(2014). “PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD ‡.” *Bolivian Journal of Chemistry* 31(2):68–81.
https://www.academia.edu/14538789/PHENOLIC_COMPOUNDS_IN_FOOD
- Ríos-Hoyo, Alejandro, María José Cortés, Huguette Ríos-Ontiveros, Eduardo Meaney, Guillermo Ceballos, and Gabriela Gutiérrez-Salmeán. (2015) “Obesity, Metabolic Syndrome, and Dietary Therapeutical Approaches with a Special Focus on Nutraceuticals (Polyphenols): A Mini-Review.” *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 84(3–4):113–23. doi: 10.1024/0300-9831/A000198.
- Shen, Zheng, Xiaohui Zhang, Jinfu Tang, Ravi Kasiappan, Umesh Jinwal, Pengfei Li, Shan Hann, Santo V. Nicosia, Jie Wu, Xiaohong Zhang, and Wenlong Bai. (2011). “The Coupling of Epidermal Growth Factor Receptor down Regulation by 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 to the Hormone-Induced Cell Cycle Arrest at the G1-S Checkpoint in Ovarian Cancer Cells.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 338(1–2):58–67. doi: 10.1016/J.MCE.2011.02.023.
- Standley, Paul, and Paul Standley. (1941). “The Forest of Guatemala.” *Tropical Woods*.
<https://www.wikizero.com/es/Standl>.
- Sun, Qian, Ram Prasad, Eben Rosenthal, and Santosh K. Katiyar. (2012). “Grape Seed Proanthocyanidins Inhibit the Invasiveness of Human HNSCC Cells by Targeting EGFR and Reversing the Epithelial-To-Mesenchymal Transition.” *PLOS ONE* 7(1):e31093. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0031093.
- Wegert, Jenny, Sabrina Bausenwein, Susanne Kneitz, Sabine Roth, Norbert Graf, Eva Geissinger, and Manfred Gessler. (2011). “Retinoic Acid Pathway Activity in Wilms Tumors and Characterization of Biological Responses in Vitro.” *Molecular Cancer* 10(1):1–13. doi: 10.1186/1476-4598-10-136/FIGURES/6.

Xiao, Jianbo, Tamar S. Muzashvili, and Milen I. Georgiev. (2014). “Advances in the Biotechnological Glycosylation of Valuable Flavonoids.” *Biotechnology Advances* 32(6):1145–56. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2014.04.006.

Zhang, Hongxia, John Birch, Zheng Feei Ma, Chaonan Xie, Haiyan Yang, Alaa El Din Bekhit, and George Dias.(2019). “Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from New Zealand and Chinese *Asparagus Officinalis* L. Roots.” *Journal of Food Science and Technology* 2019 56:2 56(2):799–810. doi: 10.1007/S13197-018-3540-0.

XII.ANEXOS

Anexo 1. Calibración para la Obtención de contenido Total de Fenoles

PHENOLIC ACIDS.

Date : 12/2/2022 Time : 16:53:45

CALIBRATION

Date: 12/2/2022 Time: 4:53:43 PM
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 502S08071606
Method: PHENGALI
Ordinate mode: Single wavelength
Baseline: No correction (0.00 0.00)
Analyst:

Wavelength(s)	Sample ID	Concentration	Ord. value	Comment
750.0	0.0 GA-0.A01	0.0000 ug/ml	0.0144	
750.0	0.0 GA-50.A02	50.000 ug/ml	0.1490	
750.0	0.0 GA-100.A03	100.00 ug/ml	0.3658	
750.0	0.0 GA-150.A04	150.00 ug/ml	0.5379	
750.0	0.0 GA-300.A05	300.00 ug/ml	1.0961	

Equation: $y = -6.488113e-03 + 3.659451e-03 * x$

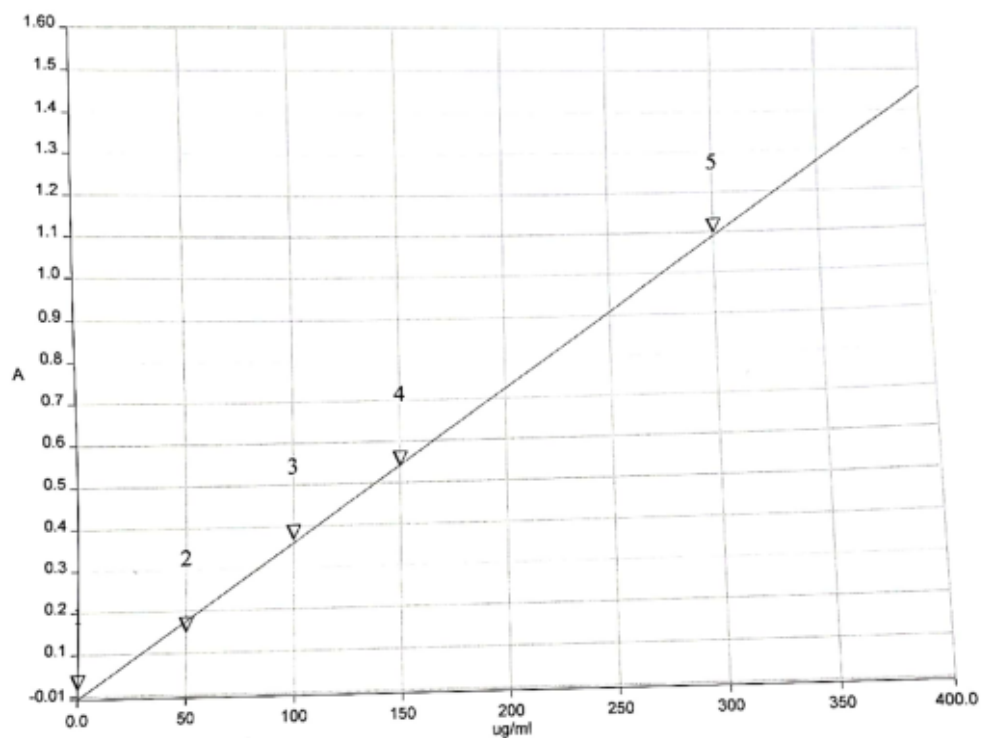
Residual error: 0.020616

Correlation coefficient: 0.999103

Anexo 2. Curva de Calibración para la Obtención de Contenido Total de Fenoles



Calibration Curve



Spectrum Name: PHENGALI

Description: $y = -6.488113\text{e-}03 + 3.659451\text{e-}03 * x$

Comments: RE = $2.061576\text{e-}02$, CC = $9.991030\text{e-}01$

Date Created: Thu Nov 17 16:17:08 2022

Anexo 3. Resultados de Contenido Total de Fenoles

Date : 12/2/2022 Time : 17:19:28

Concentration Results

Date: 12/2/2022 Time: 4:54:15 PM
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 502S08071606
Method: PHENGALI
Ordinate mode: Single wavelength
Slit: UV/VIS: 2.00 nm
Baseline: No correction (0.00 0.00)
Result Filename: DANY-PA.RCO
Autozero performed: 12/2/2022 4:53:42 PM
Analyst:

Wavelength(s)	Sample ID	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
750.0	0.0	03-P-1	1.3962	1.0000	383.31 ug/ml
750.0	0.0	03-P-2	1.1920	1.0000	327.49 ug/ml
750.0	0.0	03-P-3	1.0862	1.0000	298.59 ug/ml
750.0	0.0	03-P-4	1.0711	1.0000	294.47 ug/ml
750.0	0.0	03-P-5	1.2400	1.0000	340.62 ug/ml
		S.DEV: 36.068		MEAN 328.90	ug/ml
750.0	0.0	05-P-1	1.7434	1.0000	478.19* ug/ml
750.0	0.0	05-P-2	1.7583	1.0000	482.26* ug/ml
750.0	0.0	05-P-3	1.6070	1.0000	440.92* ug/ml
750.0	0.0	05-P-4	1.6519	1.0000	453.17* ug/ml
750.0	0.0	05-P-5	2.1320	1.0000	584.38* ug/ml
		S.DEV: 56.673		MEAN 487.78*	ug/ml
750.0	0.0	01-P-1	0.4195	1.0000	116.39 ug/ml
750.0	0.0	01-P-2	0.4866	1.0000	134.75 ug/ml
750.0	0.0	01-P-3	0.5107	1.0000	141.32 ug/ml
750.0	0.0	01-P-4	0.4723	1.0000	130.82 ug/ml
750.0	0.0	01-P-5	0.4412	1.0000	122.34 ug/ml
		S.DEV: 9.8926		MEAN 129.13	ug/ml
750.0	0.0	03-T-1	0.0756	1.0000	22.426 ug/ml
750.0	0.0	03-T-2	0.0393	1.0000	12.520 ug/ml
750.0	0.0	03-T-3	0.0456	1.0000	14.225 ug/ml
750.0	0.0	03-T-4	0.0734	1.0000	21.838 ug/ml
750.0	0.0	03-T-5	0.1027	1.0000	29.831 ug/ml
		S.DEV: 6.9835		MEAN 20.168	ug/ml
750.0	0.0	05-T-1	0.1675	1.0000	47.544 ug/ml
750.0	0.0	05-T-2	0.0924	1.0000	27.009 ug/ml
750.0	0.0	05-T-3	0.0942	1.0000	27.520 ug/ml
750.0	0.0	05-T-4	0.1120	1.0000	32.381 ug/ml
750.0	0.0	05-T-5	0.1040	1.0000	30.187 ug/ml
		S.DEV: 8.4520		MEAN 32.928	ug/ml
750.0	0.0	01-T-1	0.0297	1.0000	9.8780 ug/ml
750.0	0.0	01-T-2	0.0245	1.0000	8.4789 ug/ml
750.0	0.0	01-T-3	0.0464	1.0000	14.457 ug/ml
750.0	0.0	01-T-4	0.0749	1.0000	22.246 ug/ml
750.0	0.0	01-T-5	0.0321	1.0000	10.547 ug/ml
		S.DEV: 5.5620		MEAN 13.121	ug/ml

Anexo 4. Calibración para la Obtención de Contenido de carotenoides Totales

Total Carotenoids

Date : 12/10/2022 Time : 13:11:02

CALIBRATION

Date: 12/10/2022 Time: 1:10:59 PM
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 502S08071606
Method: CRTNDS21
Ordinate mode: Single wavelength
Baseline: No correction (0.00 0.00)
Analyst:

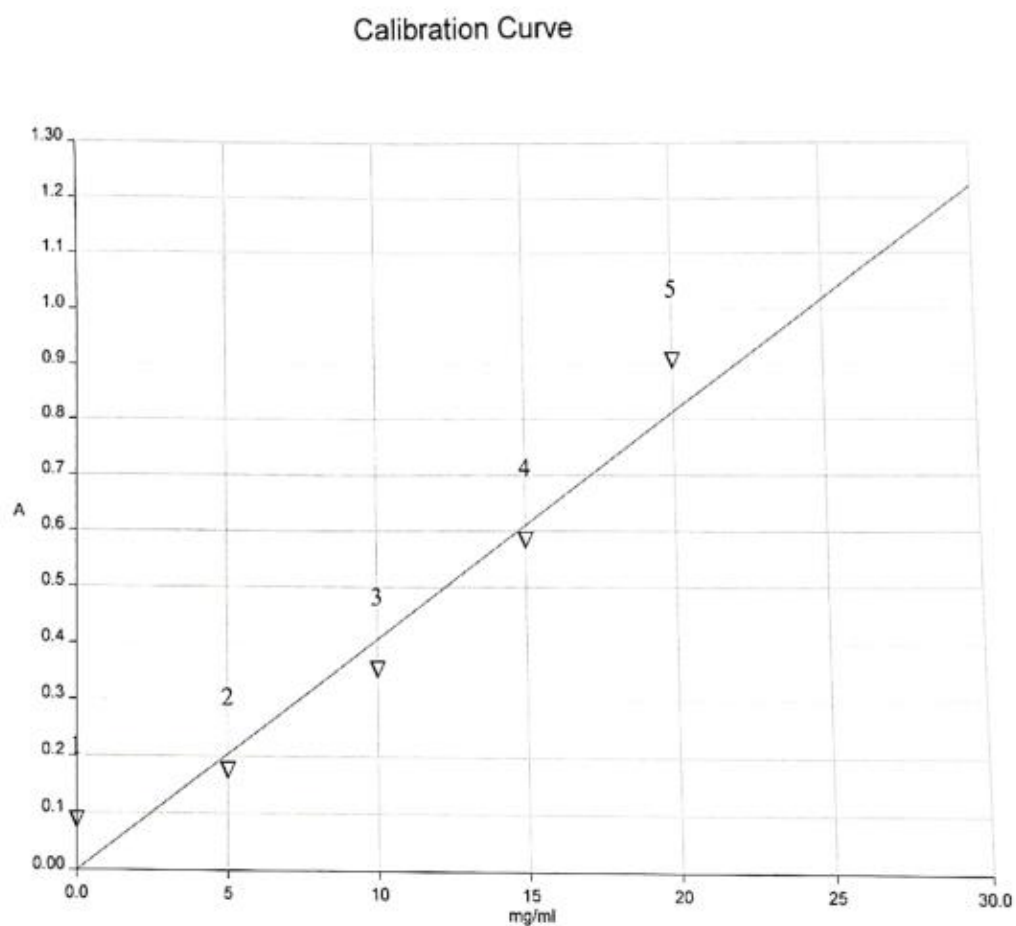
Wavelength(s)	Sample ID	Concentration	Ord. value	Comment
440.0	0.0 Ref0.A01	0.0000 mg/ml	0.0715	
440.0	0.0 Ref5.A02	5.0000 mg/ml	0.1593	
440.0	0.0 Ref10.A03	10.000 mg/ml	0.3382	
440.0	0.0 Ref15.A04	15.000 mg/ml	0.5684	
440.0	0.0 Ref20.A05	20.000 mg/ml	0.8911	

Equation: $y = 4.070087e-02 * x$

Residual error: 0.069833

Correlation coefficient: 0.977529

Anexo 5. Curva de Calibración para la Obtención de Contenido de carotenoides Totales



Spectrum Name: CRTNDS21

Description: $y = 4.070087e-02 * x$

Comments: RE = 6.983299e-02, CC = 9.775295e-01

Date Created: Wed Jun 15 17:15:57 2022

Anexo 6. Resultados de contenido de carotenoides totales

Date : 12/10/2022 Time : 13:21:37

Concentration Results

Date: 12/10/2022 Time: 1:12:49 PM
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 502S08071606
Method: CRTNDS21
Ordinate mode: Single wavelength
Slit: UV/VIS: 2.00 nm
Baseline: No correction (0.00 0.00)
Result Filename: DANY-CRT.RCO
Autozero performed: 12/10/2022 1:10:58 PM
Analyst:

Wavelength(s)	Sample ID	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
440.0	0.0 T-05-1	0.4092	1.0000	10.053 mg/ml	
440.0	0.0 T-05-2	0.1026	1.0000	2.5211 mg/ml	
440.0	0.0 T-05-3	0.4334	1.0000	10.648 mg/ml	
440.0	0.0 T-05-4	0.1085	1.0000	2.6651 mg/ml	
440.0	0.0 T-05-5	0.0944	1.0000	2.3181 mg/ml	
440.0	0.0 PI-05-1	1.3439	1.0000	33.018* mg/ml	
440.0	0.0 PI-05-2	1.3636	1.0000	33.502* mg/ml	
440.0	0.0 PI-05-3	0.3327	1.0000	8.1743 mg/ml	
440.0	0.0 PI-05-3	0.9610	1.0000	23.611 mg/ml	
440.0	0.0 PI-05-4	1.5787	1.0000	38.788* mg/ml	
440.0	0.0 PI-05-5	0.7564	1.0000	18.584 mg/ml	
440.0	0.0 PC-05-1	0.0015	1.0000	0.0369 mg/ml	
440.0	0.0 PC-05-2	0.0118	1.0000	0.2894 mg/ml	
440.0	0.0 PC-05-3	0.0550	1.0000	1.3506 mg/ml	
440.0	0.0 PC-05-4	0.0280	1.0000	0.6892 mg/ml	
440.0	0.0 SC-05-1	0.6270	1.0000	15.404 mg/ml	
440.0	0.0 SC-05-2	1.3179	1.0000	32.380* mg/ml	
440.0	0.0 SC-05-3	1.1741	1.0000	28.847 mg/ml	
440.0	0.0 SC-05-4	1.3194	1.0000	32.417* mg/ml	

Anexo 7. Calibración para la Obtención de Antioxidantes

ANTIOXIDANTS.

Date : 12/2/2022 Time : 16:24:53

CALIBRATION

Date: 12/2/2022 Time: 4:24:50 PM
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 502S08071606
Method: CONCGALI
Ordinate mode: Single wavelength
Baseline: No correction (0.00 0.00)
Analyst:

Wavelength(s)	Sample ID	Concentration	Ord. value	Comment
517.0	0.0 STD0.A01	0.0000 ug/mL	2.0627	
517.0	0.0 STD5.A02	5.0000 ug/mL	1.5901	
517.0	0.0 STD10.A03	10.000 ug/mL	1.4030	
517.0	0.0 STD20.A04	20.000 ug/mL	0.9865	
517.0	0.0 STD40.A05	40.000 ug/mL	0.2507	

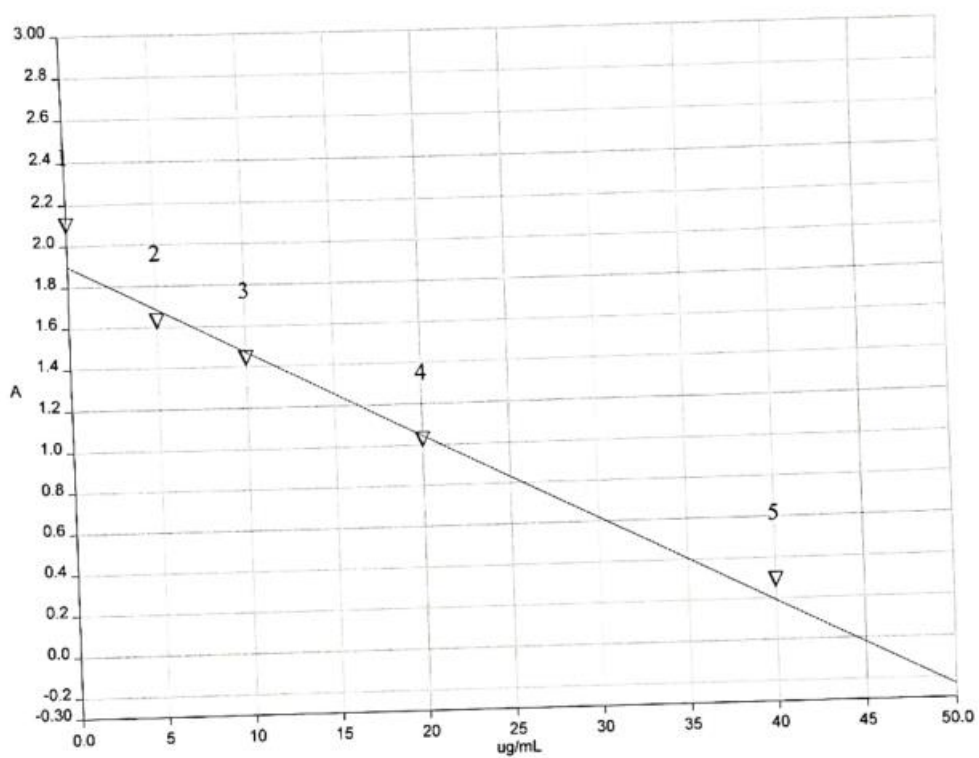
Equation: $y = 1.898456e+00 + -4.265735e-02 * x$

Residual error: 0.126044

Correlation coefficient: 0.987156

Anexo 8. Curva de Calibración para la Obtención de Antioxidantes

Calibration Curve



Spectrum Name: CONCGALI

Description: $y = 1.898456e+00 + -4.265735e-02 * x$

Comments: RE = 1.260438e-01, CC = 9.871556e-01

Date Created: Fri Nov 04 17:44:10 2022

Anexo 9. Resultados de Contenido de Antioxidantes



Date : 12/2/2022 Time : 16:44:34

Concentration Results

Date: 12/2/2022 Time: 4:25:50 PM
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 502S08071606
Method: CONCGALI
Ordinate mode: Single wavelength
Slit: UV/VIS: 2.00 nm
Baseline: No correction (0.00 0.00)
Result Filename: ANT-DANY.RCO
Autozero performed: 12/2/2022 4:24:50 PM
Analyst:

Wavelength(s)	Sample ID	Ordinate	Factor	Concentration	Sample Info
517.0	0.0	03-P-1	0.3323	1.0000	36.714 ug/mL
517.0	0.0	03-P-2	0.3045	1.0000	37.365 ug/mL
517.0	0.0	03-P-3	0.1993	1.0000	39.832 ug/mL
517.0	0.0	03-P-4	0.2432	1.0000	38.802 ug/mL
517.0	0.0	03-P-5	0.3162	1.0000	37.093 ug/mL
517.0	0.0	05-P-1	0.4866	1.0000	33.097 ug/mL
517.0	0.0	05-P-2	0.2276	1.0000	39.168 ug/mL
517.0	0.0	05-P-3	0.2927	1.0000	37.644 ug/mL
517.0	0.0	05-P-4	0.3434	1.0000	36.454 ug/mL
517.0	0.0	05-P-5	0.4393	1.0000	34.206 ug/mL
517.0	0.0	01-P-1	0.2072	1.0000	39.647 ug/mL
517.0	0.0	01-P-2	0.2547	1.0000	38.533 ug/mL
517.0	0.0	01-P-3	0.2763	1.0000	38.027 ug/mL
517.0	0.0	01-P-4	0.2344	1.0000	39.009 ug/mL
517.0	0.0	01-P-5	0.2714	1.0000	38.142 ug/mL
517.0	0.0	03-T-1	1.2971	1.0000	14.096 ug/mL
517.0	0.0	03-T-2	1.3410	1.0000	13.069 ug/mL
517.0	0.0	03-T-3	1.3337	1.0000	13.238 ug/mL
517.0	0.0	03-T-4	1.4199	1.0000	11.218 ug/mL
517.0	0.0	03-T-5	1.2935	1.0000	14.181 ug/mL
517.0	0.0	05-T-1	1.3684	1.0000	12.424 ug/mL
517.0	0.0	05-T-2	1.3794	1.0000	12.168 ug/mL
517.0	0.0	05-T-3	1.3605	1.0000	12.611 ug/mL
517.0	0.0	05-T-4	1.3388	1.0000	13.119 ug/mL
517.0	0.0	05-T-5	1.3624	1.0000	12.566 ug/mL
517.0	0.0	01-T-1	1.3632	1.0000	12.547 ug/mL
517.0	0.0	01-T-2	1.3767	1.0000	12.231 ug/mL
517.0	0.0	01-T-3	1.3236	1.0000	13.477 ug/mL
517.0	0.0	01-T-4	1.3158	1.0000	13.658 ug/mL
517.0	0.0	01-T-5	1.3996	1.0000	11.695 ug/mL

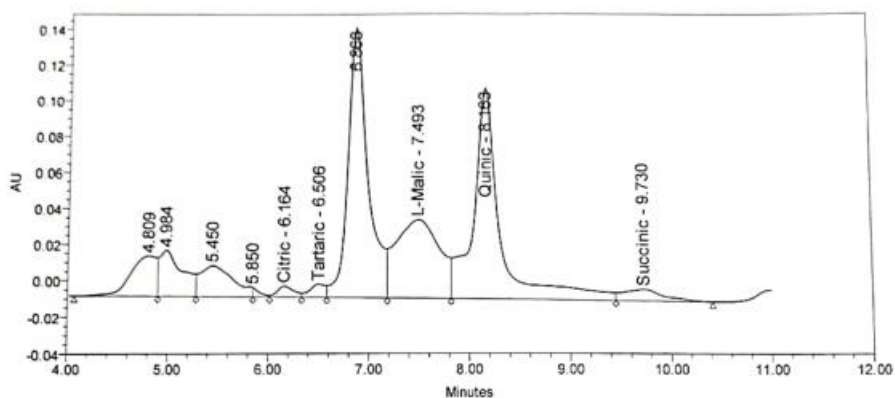
Anexo 10. Resultados de Contenido total de ácidos orgánicos



OA Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	D-TU-5	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ALLEN and DANY ORGANIC ACID
Vial:	46	Acq. Method Set:	Organic MET SET
Injection #:	1	Processing Method:	Organic Process Met
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	11.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	Wednesday, December 07, 2022 2:10:07 AM CST -06:00		
Date Processed:	Wednesday, December 07, 2022 10:29:54 AM CST -06:00		



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units	% Amount
1		4.809	402814	5.72	22228			
2		4.984	408424	5.80	25488			
3		5.450	388247	5.51	17015			
4		5.850	22878	0.32	5107			
5	Citric	6.164	67696	0.96	5974	0.017		2.08
6	Tartaric	6.506	76320	1.08	7141	0.006		0.72
7		6.868	2067362	29.37	150930			
8	L-Malic	7.493	1283989	18.24	43189	0.200		24.63
9	Quinic	8.163	2148720	30.52	117035	0.543		66.79
10	Succinic	9.730	173707	2.47	6232	0.047		5.79

Reported by User: System
 Report Method: OA Default Individual Report
 Report Method ID: 2120
 Page: 1 of 1

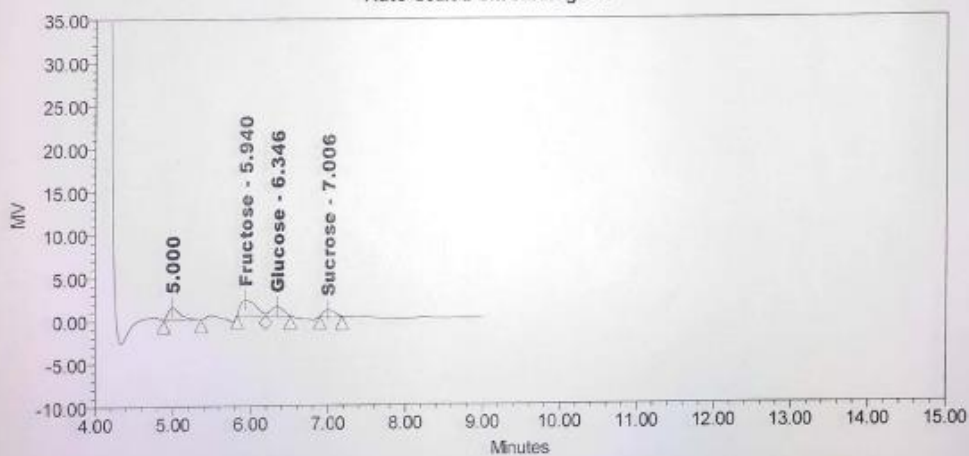
Project Name: Default(Organic Acid)
 Date Printed:
 Wednesday, December 07, 2022
 10:29:54 AM US/Central

Anexo 11. Resultados de contenido total de azucres

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	D-TU-1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	1 ALLEN DANY SMOOTHIE NEW
Vial:	5	Acq. Method Set:	Sugar Method Set 2
Injection #:	1	Processing Method:	Sugar Process 410
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	9.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired: 11/12/2022 10:30:39 PM CST			
Date Processed: 11/14/2022 4:43:45 PM CST			

Auto-Scaled Chromatogram



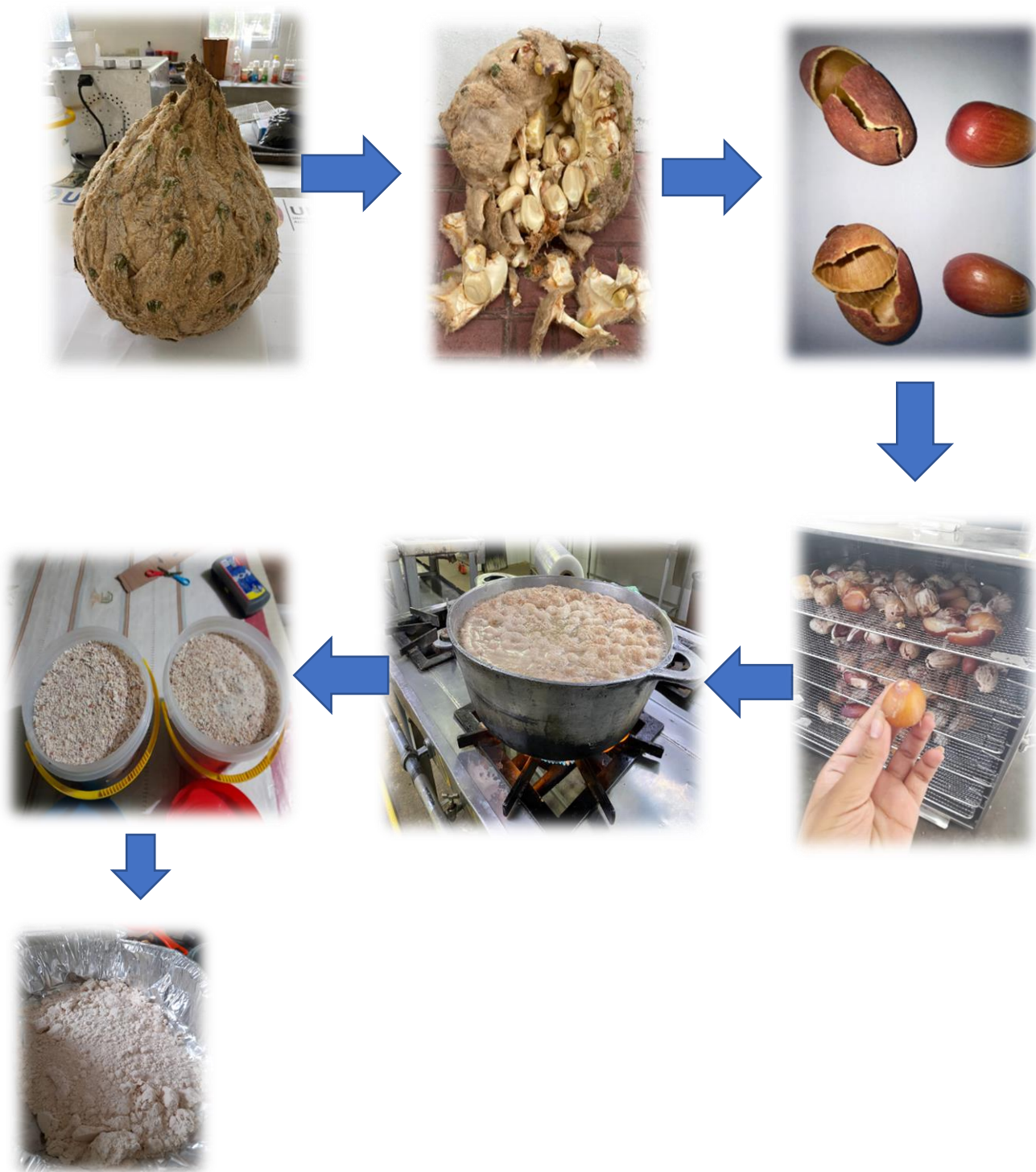
Peak Results

Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units	% Amount
1	5.000	15709	25.67	1499			
2 Fructose	5.940	25277	41.30	1821	0.049		55.43
3 Glucose	6.346	12387	20.24	1130	0.025		27.83
4 Sucrose	7.006	7826	12.79	778	0.015		16.74
5 Maltose	7.889						

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 14257
Page: 1 of 1

Project Name: Default\Sugars
Date Printed:
11/14/2022
4:43:45 PM US/Central

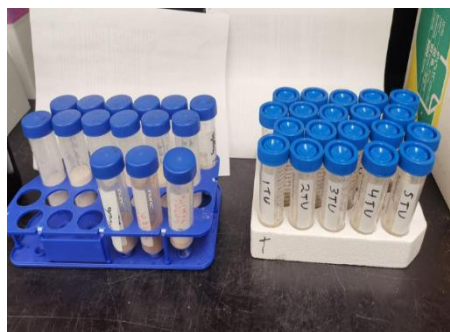
Anexo 12. Proceso para la obtención de harina de *Dioon mejiae* (teosinte)



Anexo 13. Insumos y equipo de laboratorio para la extracción de moléculas bioactivas

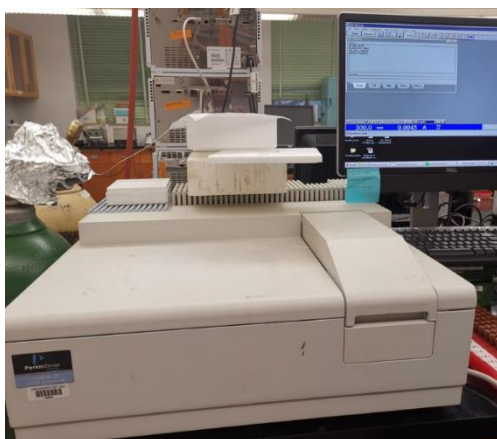


Anexo 14. Insumos y equipo de laboratorio para la extracción de moléculas bioactivas

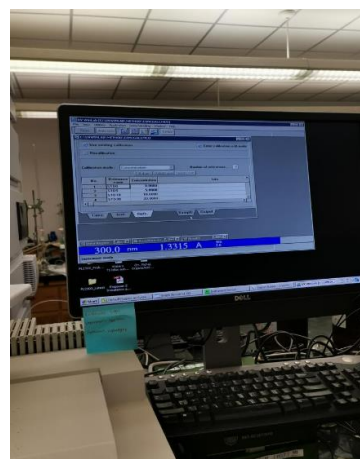
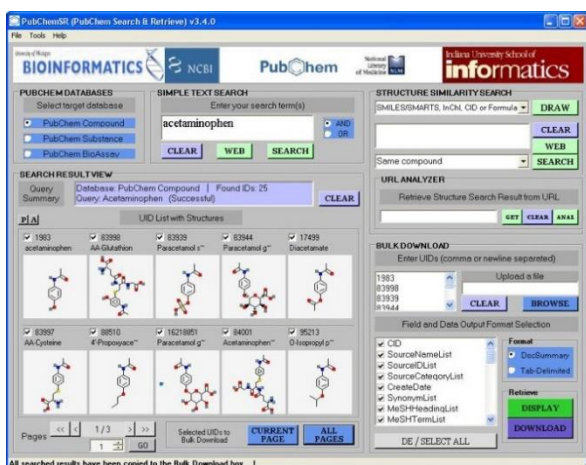


Anexo 15.

Equipo de laboratorio para la validación de moléculas bioactivas



Anexo 16. Programas SciFinder y PubChem. para la identificación de moléculas bioactivas



Anexo 17. Realización de actividades en laboratorio



Anexo 18. Equipo de laboratorio

