

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

Finalidad y contenido mínimo de los informes de conformidad con el Decreto Ejecutivo 31514-MINAE y sus reformas

1 Información general:

a. Título del proyecto: **Formulación de un prototipo de uso tópico a partir de extractos de fresa (*Fragaria x ananassa*, variedad Festival) ricos en antocianinas**

b. Tipo de permiso de acceso a los elementos o recursos genéticos y bioquímicos: **proyecto de Bioprospección.**

1. c. Nombre del interesado:

Investigador coordinador:

Dra. Laura Andrea Calvo Castro 2020-2021 (Biología)

Dra. Karla Salas Arias 2022-2023 (Biología)

Investigadores colaboradores:

Dra. Ana Abdelnour Esquivel (Biología- pensionada)

Dr. Fabián Villalta Romero (Biología)

Lic. Johan Morales Sánchez (Biología)

Dr. Andrés Sánchez Kopper (Química)

d. Número de expediente: **CM-ITCR-001-2022**

e. Número de Resolución administrativa del permiso de acceso: **R-CM-ITCR-001-2022-OT-CONAGEBIO**

f. Fecha de elaboración del informe: **diciembre 2024**

2 Información sobre las muestras accedidas

a. Lista de las muestras accedidas, la cual debe incluir: clase, orden, familia, género y especie (si no se conoce la taxonomía a nivel de especie, describa el material a nivel taxonómico más cercano), código de la muestra, la cantidad de material, el nombre del sitio y fecha de colecta. Debe incluir las coordenadas geográficas correspondientes en grados decimales (WGS84). Esta información deberá ser entregada en formato digital, como un archivo anexo a este documento, el cual debe ser una hoja electrónica, cuyo formato puede descargar de la sección de plantillas de la plataforma virtual. **Anexo 1**

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

b. Los números de acceso de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos publicadas en bases de datos de libre acceso, en caso de que se produzcan: **No aplica para el proyecto.**

c. Indicar si las muestras fueron destruidas durante el proceso de análisis o si existen materiales guardados de dichas muestras. En caso de que las muestras no sean destruidas en el proceso, debe incluir la ubicación de las mismas (nombre de establecimientos, empresas, laboratorios, centros e institutos de investigación y universidades y dirección exacta) con la información del contacto responsable (nombre completo, número de teléfono y correo electrónico): **Las muestras fueron procesadas durante la investigación.**

3 Resultados por objetivo. Por cada uno de los objetivos especificados dentro del formulario de Guía Técnica del Proyecto presentado ante la Oficina Técnica para la solicitud del permiso, deberá de indicarse los resultados alcanzados.

Objetivo general: Desarrollar un prototipo natural de uso tópico con potencial aplicación biomédica basado en extractos ricos en antocianinas extraídas de fresas (<i>Fragaria x ananassa</i> , variedad Festival).		
Objetivos específicos	Actividades	Productos
OE1. Establecer condiciones de cultivo y multiplicación in vitro de fresa maximizando la producción de antocianinas.	1.1. Tramitar y obtener permisos de la CONAGEBIO para coleccionar las plantas.	<u>Anexo 2</u>
	1.2. Colectar plantas de fresa (en almácigo) de la variedad Festival en la zona norte de Cartago.	<u>Anexo 3</u> <u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u> <u>Anexo 6</u>
	1.3. Determinación del perfil fitoquímico general de las hojas de fresa en términos de polifenoles totales y presencia o ausencia de alcaloides.	<u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u>
	1.4. Desinfección e introducción del material experimental <i>in vitro</i> .	<u>Anexo 5</u>
	1.5. Establecimiento y multiplicación in vitro de la variedad Festival en medio semi-sólido en condiciones estándar control y con tres tratamientos.	<u>Anexo 5</u>
	1.6. Evaluación macroscópica de las plántulas de fresa cultivadas en los diferentes tratamientos in vitro: (color y tamaño de hojas, tallos y raíces)	<u>Anexo 5</u>

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

	1.7. Determinación del perfil fitoquímico general de plántulas de fresa (10 g/muestreo) bajo condiciones control y bajo los tres tratamientos, a partir de extractos hidroalcohólicos	<u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u>
	1.8. Comparación estadística del contenido de polifenoles totales de plantas obtenidas de almácigo vs. plantas cultivadas in vitro con tres tratamientos y su control.	<u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u>
OE2. Caracterizar el perfil fitoquímico de polifenoles del extracto estandarizado rico en polifenoles totales y en antocianinas, obtenido de plantas de fresa	2.1. Optimización del método de extracción de polifenoles totales a partir de plantas de fresa (seleccionadas del OE1).	<u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u>
	2.2. Preparación de extractos estandarizados respecto al contenido de polifenoles totales.	<u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u>
	2.3. Análisis de composición proximal de los extractos estandarizados	<u>Anexo 4</u>
	2.4. Cuantificación del contenido de catequina, quercetina, catequina, quercetina, kaempferol y ácido elágico por HPLC.	<u>Anexo 4</u> <u>Anexo 5</u>
	2.5. Purificación, identificación y cuantificación del contenido de antocianinas en el extracto estandarizado de plantas de fresa, mediante HPLC-MS.	<u>Anexo 4</u>
OE3. Evaluar el potencial bioactivo (citotoxicidad en células de piel, potencial regenerativo en modelos de piel in vitro, y capacidad fotoprotectora) del extracto de fresa estandarizado.	3.1. Determinación de la citotoxicidad (IC50) del extracto estandarizado en células de piel.	<u>Anexo 4</u>
	3.2. Determinación del efecto regenerativo del extracto estandarizado en modelos de piel in vitro.	<u>Anexo 4</u>
	3.3. Comparación de la histología patológica y de la citotoxicidad de un modelo de piel in vitro tratado con UVB/UVA en presencia y ausencia del extracto.	<u>Anexo 4</u>
	3.4. Determinación del efecto antioxidante del extracto.	<u>Anexo 4</u>

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

OE4. Preparar una formulación natural de uso tópico a base del extracto estandarizado de fresa rico en antocianinas	4.1. Elaboración de una formulación de uso tópico (crema, gel, ungüento) a base del extracto estandarizado, empleando aceites y grasas naturales y surfactantes de grado alimenticio.	<u>Anexo 6</u>
Divulgación	Conferencias	<u>Anexo 7</u>

4 Análisis general de los resultados

Los fitoquímicos antioxidantes representan una fuente alternativa para el desarrollo de productos tópicos con potencial bioactivo. Los frutos rojos, especialmente las bayas (fresas, moras, frambuesas), son de especial interés debido a que contienen antocianinas y otros pigmentos con alto potencial antioxidante y antiinflamatorio. La presente propuesta planteó analizar el perfil fitoquímico en hojas de plantas de fresa de la zona norte de Cartago y compararlo con plántulas de fresa cultivadas *in vitro*, con el fin de identificar las condiciones de cultivo óptimas para elicitar mayor producción de fitoquímicos y aprovecharlos para formular un prototipo natural de uso tópico con potenciales aplicaciones biomédicas. Los resultados, fueron evidenciados en 4 artículos científicos, en los cuales los extractos de polifenoles totales de hojas de fresa exhibieron un contenido total de polifenoles 122 veces mayor y una actividad antioxidante (ORAC) 13 veces mayor que los frutos de fresa, y mostraron evidencia de posible efecto fotoprotector contra el daño ultravioleta en células de melanoma humano (SK-MEL-28) y en fibroblastos de embriones murinos (NIH/3T3), junto con prometedoras actividades antiproliferativas contra las células de melanoma. El ácido gálico fue el polifenol más abundante encontrado en las hojas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados mostraron cantidades mayores y una acumulación más rápida de polifenoles en las plantas regeneradas *in vitro*, evidenciando la relevancia de las estrategias de cultivo de tejidos *in vitro* para producir compuestos como polifenoles en esta especie y cultivar. Se prepararon dos formulaciones tópicas comerciales (gel acuoso y crema aceite/agua) con tres concentraciones de activo ingrediente (0,02, 0,1 y 1% extracto de hoja de fresa). Las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones se monitorearon durante 45 días a diferentes temperaturas. Las formulaciones a base de crema fueron las óptimas para el desarrollo de un prototipo tópico con extracto de hoja de fresa con potenciales actividades bioactivas.

5 Conclusiones

Con el desarrollo de esta investigación se caracterizaron siete polifenoles en plántulas de campo (Ácido Gálico, Ácido Cafeico, Ácido Clorogénico, Ácido p-cumarico, Rutina, Ácido Elágico, Quercetina) y siete polifenoles en plántulas *in vitro* (Ácido Gálico, Catequina, Ácido Cafeico, Ácido Clorogénico, Ácido p-cumarico, Ácido Elágico y Quercetina). Con respecto a la abundancia bioactiva, la misma depende de la incidencia

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

de los tratamientos elicitors. La mejor condición de extracción hidroalcohólica fue obtenida con etanol al 70%. Para el efecto Biactivo, se observó una disminución de la viabilidad celular sobre las células SK-Mel 28 para los ensayos de Fotoprotección y Regeneración al disminuir la viabilidad celular. Se desarrollaron formulaciones en crema y gel; considerando el gel con la concentración de 0.1% la más adecuada debido, a una mejor viscosidad y estabilidad con efecto apropiado para ser usado como prototipo tópico.

Por lo anterior, se recomienda incentivar el desarrollo de más investigaciones básicas y aplicadas para la búsqueda de compuestos fitoquímicos de gran valor comercial por medio de desechos agroindustriales para la industria alimenticia, médica y cosmética, con el propósito de contribuir con el desarrollo Nacional y su aporte a la integración de los Objetivos del Desarrollo Sostenible.

6 Recomendaciones para la conservación y el manejo de las especies, si procede: **No procede.**

7 Información sobre avances generales de algún producto y sus posibilidades de comercialización, si procede: **Anexo 6** y a la fecha no ha procedido **para comercialización.**

8 Información sobre charlas, talleres u otras actividades de capacitación que se realicen como parte de la distribución no monetaria de beneficios. Dicha información debe tener como mínimo: Título y fecha de la actividad, listas de asistencia, fotografías y contenido de la actividad de capacitación **Anexo 7.**

Nombre de obra	Tipo de obra	Estado (aceptado por publicar y publicado)	Nombre de Evento
Avance de tesis doctoral: Producción de extractos naturales de hojas de plantas de Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> , variedad Festival) con potencial bioactivo para la elaboración de un prototipo de uso tópico.	Seminario	-	XXV Seminario Internacional DOCINADE 2020
	Seminario	-	XXVI Seminario Internacional DOCINADE 2021
	Seminario	-	XXVII Seminario Internacional DOCINADE 2022
	Seminario	-	XXVIII Seminario Internacional DOCINADE 2023
Empleo de Residuos Agroindustriales para la obtención de compuestos con mayor valor agregado	Seminario	-	Seminario Área de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación en Biotecnología, 2021
Caracterización fitoquímica de compuestos bioactivos en extractos etanólicos de hoja de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> var. Festival)	Ponencia	-	Encuentro Bienal de Investigación y Postgrado, Centro América y el Caribe - Honduras 2021



**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

II Seminario Internacional de Ciencia y Tecnología Agroindustrial.	Seminario	-	Universidad del Tolima y Maestría en Ciencia y Tecnología Agroindustrial 2022.
Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>) en Costa Rica Autores: Karla Salas Arias, Bridget Salas Morgan, Laura A. Calvo Castro.	Artículo científico	Publicado	Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Strawberry <i>Fragaria x ananassa</i> cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts Autores: Karla Salas-Arias, Andrea Irías-Mata, Andrés Sánchez-Kopper, Ricardo Hernández-Moncada, Bridget Salas-Morgan, Fabián Villalta-Romero, Laura A. Calvo-Castro	Artículo científico	Publicado	Molecules
Polyphenols in strawberry leaves: experiments in <i>Fragaria x ananassa</i> cv. Festival in vivo and in vitro Autores: Karla Salas-Arias, Andrea Irías-Mata, Laura Sánchez-Calvo, María Fernanda Brenes-Zárate, Ana Abdelnour-Esquivel, Fabián Villalta-Romero, Laura A. Calvo-Castro	Artículo científico	Publicado	Molecules
Incorporating strawberry leaf extract from waste biomass in prototype topical gel and cream formulations. Autores: Karla Salas-Arias, Fabián Villalta-Romero, Randall Chacón-Cerdas, David Hidalgo-Paniagua, Laura A. Calvo-Castro	Artículo científico	Publicado	Revista Tecnología en Marcha Instituto Tecnológico de Costa Rica

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

9 En caso de que existan beneficios monetarios, aportar copias de los comprobantes de depósito. **No procede.**

10 Indicar si existen actividades pendientes de desarrollar, por ejemplo, pagos, capacitaciones o publicaciones. **No hay actividades pendientes por ejecutar.**

11 Bibliografía de respaldo. **Anexo 3, 4, 5 y 6.**

12. Anexos.

Informes para proyectos de aprovechamiento económico.

Además de lo indicado en el Artículo 31 de este Decreto Ejecutivo, el interesado debe aportar la siguiente información:

1. Datos de los ingresos brutos y netos obtenidos por la comercialización del producto en el período establecido por la Oficina Técnica en la Resolución del permiso de acceso. **No aplica para este proyecto.**

2. Documentación que respalde los beneficios monetarios y no monetarios recibidos por el proveedor. **No aplica para este proyecto.**

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

Anexo 1. Muestras Accesadas

Autoguardado

PlantillaMuestrasInsitu (Fresa, variedad Festiv...

Buscar (Alt+Q)

Karla Melisa Salas Arias

Archivo

Inicio

Insertar

Disposición de página

Fórmulas

Datos

Revisar

Vista

Ayuda

Comentarios

Pegar

Portapapeles

Calibri

12

A⁺

A⁻

N

K

S

U

Color

Color

Alineación

General

Número

Estilos

Celdas

Edición

Analizar datos

H25

X

✓

fx

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Género y especie	Tipo de Muestra	Tamaño de la muestra (peso, volumen, área, etc)	Número de muestras por sitio de acceso	Sitio de colecta	Fecha de colecta	Latitud (en grados decimales WGS84)	Longitud (en grados decimales WGS84)
2	Fresa (Fragaria x ananassa., variedad Festival	Planta (estolones)	40	40	Llano Grande de Cartago empresa Agrocarrio S.A	2022	9.933723°	83.919398°
3								
4								



**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

Anexo 2. Aval CONAGEBIO



**MINISTERIO DE AMBIENTE Y ENERGÍA
COMISIÓN NACIONAL PARA LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD
OFICINA TÉCNICA**

**SAN JOSÉ, COSTA RICA
R-CM-ITCR-001-2022-OT-CONAGEBIO**

Expediente: CM-ITCR-001-2022

COMISIÓN NACIONAL PARA LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD, OFICINA TÉCNICA.
San José, a las 08:00 horas del 31 de marzo de 2022.

Se conoce solicitud para permiso de acceso a elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad, gestionado por Instituto Tecnológico de Costa Rica, cédula jurídica 4000042145, representada legalmente por Laura Andrea Calvo Castro, cédula 111980353 en adelante conocido como el Interesado, para el proyecto de Bioprospección denominado **"Formulación de un prototipo de uso tópico a partir de extractos de fresa (*Fragaria x ananassa*., variedad Festival) ricos en antocianinas"**, en adelante conocido como el proyecto.

RESULTANDO

PRIMERO: Que el día 5 de mayo del 2014, la señora Ana Lorena Guevara Fernández, con cédula de identidad 1-0538-0559 en representación de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, en adelante CONAGEBIO; y el señor Julio Calvo Alvarado, con cédula de identidad 1-0639-0541, en representación del Instituto Tecnológico de Costa Rica con cédula jurídica 4-000-42145, firmaron el Convenio Marco.

SEGUNDO: El día 7 de setiembre del 2016, el señor Julio Calvo Alvarado, con cédula de identidad 1-0639-0541, en representación del Instituto Tecnológico de Costa Rica con cédula jurídica 4-000-42145, presentó en la Oficina Técnica de CONAGEBIO el formulario para el Registro de Interesados para el permiso de Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad o al Conocimiento Tradicional Asociado, Código de Conducta, Declaración Jurada y certificaciones legales de conformidad con el Convenio Marco.

TERCERO: ITCR Que el día 22 de abril del 2019, la señora María Pamela Castillo Barahona con cédula de identidad número 1-1055-0955, en calidad de Presidenta y Representante Legal con facultades suficientes de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, en adelante CONAGEBIO y el señor Julio Calvo Alvarado, con cédula de identidad 1-0639-541 en calidad de Rector y Representante legal con facultades suficientes del Instituto Tecnológico de Costa Rica con cédula jurídica 4-000-042145, firmaron una Prórroga del Convenio Marco por 5 años.

R-CM-ITCR-001-2022-OT-CONAGEBIO. San José, a las 08:00 horas del 31 de marzo del 2022.

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

CUARTO: Que el día 07 de septiembre de 2021, Laura Andrea Calvo Castro, con cédula de identidad 111980353, en representación de Instituto Tecnológico de Costa Rica con cédula jurídica 4000042145, presentó en la Oficina Técnica de CONAGEBIO el formulario solicitud y guía técnica para realizar el proyecto de Bioprospección.

QUINTO: Que el día 03 de marzo de 2022, se recibió en la Oficina Técnica, el Contrato para el otorgamiento del Consentimiento Previamente Informado (CPI) entre el Interesado y Agrocarico Sociedad Anónima cédula jurídica 3-101-367837, representada por Minor Francisco Fernández Monge, cédula de identidad 3-0258-0164 actuando como apoderado generalísimo sin límites de suma, en calidad de asociación como Proveedor, suscrito en fecha 17 de febrero de 2022.

SEXTO: Que en cumplimiento de lo establecido en el artículo 18 Bis de la Ley para mejorar la lucha contra el fraude fiscal, Ley No. 9416, el día 30 de marzo de 2022 se llevó a cabo la consulta de acceso público en el Sistema que el Ministerio de Hacienda ha dispuesto para tales efectos, con el fin de verificar la situación tributaria de los sujetos obligados ante la Dirección General de Tributación, obteniendo como información que las partes (Interesado y Proveedor) se encuentran al día en sus obligaciones tributarias, o no se encuentran registrados en dichas plataformas.

SÉTIMO: Que ese mismo día se consultó acerca de la morosidad ante la Caja Costarricense de Seguro Social, obteniendo como información que tanto Interesado como Proveedor se encuentran al día en sus obligaciones o no se encuentran registrados en dichas plataformas.

OCTAVO: Que el día 31 de marzo del 2022, se refrendó por la Oficina Técnica de CONAGEBIO el Contrato para el otorgamiento del Consentimiento Previamente Informado mencionado.

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que el artículo 6 de la Ley de Biodiversidad N° 7788 publicada el 27 mayo de 1998, dispone que las propiedades bioquímicas y genéticas de los elementos de la Biodiversidad silvestres y domesticados son de dominio público. El Estado autorizará la exploración, investigación, bioprospección, uso y aprovechamiento de los elementos de la biodiversidad que constituyen bienes de dominio público, así como la utilización de todos los recursos genéticos y bioquímicos, por medio de las normas generales de acceso.

SEGUNDO: Que con fundamento en los artículos 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 de la Ley de Biodiversidad, N° 7788, se establece que para cumplir los objetivos, el Ministerio del Ambiente y Energía, coordinará la organización administrativa encargada del manejo y la conservación de la biodiversidad, integradas por la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad y el Sistema Nacional de Áreas de Conservación.

TERCERO: Que los artículos del 62 al 85 del Capítulo V de la Ley supracitada, declaran a la CONAGEBIO como la organización responsable de regular el acceso a los elementos o recursos genéticos y bioquímicos de la Biodiversidad y a la Protección del conocimiento asociado.

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

CUARTO: Que el Interesado cumplió con el procedimiento y los requisitos necesarios para obtener el permiso de acceso, de conformidad con la Ley de Biodiversidad N° 7788 y las Normas Generales para el Acceso a los elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad, Decreto Ejecutivo N° 31514-MINAE y el Convenio Marco suscrito con la CONAGEBIO.

QUINTO: Que la presente solicitud de investigación se ha valorado de conformidad con los criterios establecidos en los artículos 14 y 24 de las Normas Generales para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad y se concluye que cumple con lo establecido en dichos artículos.

POR TANTO,

LA DIRECTORA EJECUTIVA DE LA OFICINA TÉCNICA

RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar a Instituto Tecnológico de Costa Rica, cédula jurídica 4000042145, representada legalmente por Laura Andrea Calvo Castro, cédula 111980353 la solicitud de acceso para el proyecto de Bioprospección titulado **“Formulación de un prototipo de uso tópico a partir de extractos de fresa (Fragaria x ananassa., variedad Festival) ricos en antocianinas”**, de conformidad con el contrato para el otorgamiento del consentimiento previamente informado, el formulario de Guía Técnica y los siguientes términos:

1. Material a acceder, muestras in situ:

Género y especies	Tipo de Muestra	Cantidad de muestra	Número de muestras por sitio de acceso
Fresa (Fragaria x ananassa., variedad Festival)	Plantas	40	40

2. Método de colecta científica y análisis de muestras que se utilizará:

El proveedor de la materia prima, se encargará de tomar las plantas indicadas por los investigadores para una mejor manipulación de las mismas. Serán dispuestas en cajas de cartón para su traslado al laboratorio e invernadero. Empleo específicamente de estolones.

OE1. Establecer condiciones de cultivo y multiplicación in vitro de fresa maximizando la producción de antocianinas.

1.2.1 Colectar plantas de fresa (en almácigo) de la variedad Festival en la zona norte de Cartago. Se colectarán al menos 40 plantas de fresa de la variedad Festival (en almácigo) de

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

una plantación agrícola situada en Tierra Blanca de Cartago. De las 40 plantas, inicialmente solo se van a usar 20 en los experimentos. Los otros 20 restantes plantas, se mantendrán en el invernadero de investigación del CIB como materia prima para el resto de los experimentos futuros.

1.2.2 Determinación del perfil fitoquímico general de las hojas de fresa. Para tener una línea base respecto al contenido de polifenoles en las hojas de las plantas de fresa obtenidas del campo, se preparará un extracto hidroalcohólico (1:9 peso seco: etanol 70%) de hojas secas de las plantas en invernadero (10 g, n = 3, secado en horno a 40°C), extraídas por maceración (3 extracciones consecutivas de 4 h c/u a 25°C, 100 rpm) y concentradas a sequedad en un rotavapor. El extracto en polvo se resuspenderá a una concentración de 1 mg/ml m/v en etanol y se cuantificará su contenido de polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu), contenido de cianidina-3-glucósido (estándar de antocianinas, HPLC), y presencia de alcaloides en cromatografía de capa fina (contratación de servicios, CINAT).

1.3.1. Desinfección e introducción del material experimental in vitro. Del material mantenido en invernadero, se trasladará al laboratorio del Centro de Investigación en Biotecnología para realizar un protocolo de desinfección. Para ello, se realizará un lavado con agua y jabón. Se cortarán explantes de 3 cm de largo y se colocarán en alcohol de 70% durante 10 segundos, después se colocarán en una solución de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) en una disolución de 20%, durante un periodo de inmersión de 20 min y finalmente se aplicarán tres lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Posteriormente, se cultivarán en un MS sencillo (Medio basal y vitaminas Murashige & Skoog (M&S) (1962), suplementado con 30 g/l de sacarosa y 3,2 g/l de Phytgel, a pH de 5,7) [26].

1.3.2. Establecimiento y multiplicación in vitro de fresa en medio semi-sólido. Se iniciará la fase de multiplicación del material vegetal en condición aséptica y se establecerá un "stock" (n = 20) para la experimentación de las fases posteriores. Se evaluará el siguiente medio semisólido: medio basal y vitaminas Murashige & Skoog (M&S) (1962), suplementado con 4g/L de cisteína, 30 g/l de sacarosa y 3,2 g/l de Phytgel, a pH de 5,7. Las condiciones de cultivo serán luz difusa a una temperatura de 25 ± 2 °C, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El tiempo de subcultivo será de 30 días, y la multiplicación se realizará subcultivando los brotes y las microestacas [26]. Las plántulas (n = 20/tratamiento) serán también sometidas a tres tratamientos que podrían potenciar la producción de antocianinas (las cuales se producen como una respuesta a condiciones de estrés): baja temperatura (8 h a 12°C), luz UV (4 h bajo una lámpara UVA/UVB), y un elicitador de estrés biológico (inóculo de hongos fitopatógenos inactivados por calor).

1.3.3. Evaluación macroscópica de las plántulas de fresa cultivadas en los diferentes tratamientos in vitro: (color y tamaño de hojas, tallos y raíces). Se evaluará el efecto de los tratamientos (temperatura, luz UV y estrés biótico) en el desarrollo de las plántulas (color y tamaño del tallo, hojas y raíces) respecto al control en condiciones de cultivo estándar. Los resultados serán analizados por medio de un Anova de modelo lineal general con análisis de covarianzas entre los factores analizados.

1.4.1. Determinación del perfil fitoquímico general de plántulas de fresa bajo condiciones control y bajo los tres tratamientos. Utilizando el mismo método de extracción indicado en 1.2.2., se evaluará in vitro el efecto de tres tratamientos en la concentración de polifenoles totales (Folin Ciocalteu) y contenido de antocianinas (cianidina-3-glucósido, HPLC) en las

4

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

plántulas. Para ello, se compararán estas variables en plántulas ($n = 20/\text{tratamiento}$) mantenidas en condiciones estándar control y en plántulas con cada uno de tres tratamientos: baja temperatura (8 h a 12°C), luz UV (4 h bajo una lámpara UVA/UVB), y un elicitador de estrés biológico (inóculo de hongos fitopatógenos inactivados por calor). También se evaluará la presencia de alcaloides en cromatografía de capa fina (contratación de servicios, CINAT). Los alcaloides son indeseables para este experimento, y su presencia en altas concentraciones implicaría modificaciones al protocolo de extracción para eliminarlos del extracto.

1.4.2. Comparación estadística del contenido de polifenoles totales y contenido de antocianinas de plantas obtenidas de almácigo vs. plantas cultivadas in vitro con tres tratamientos y su control. Los resultados de los experimentos anteriores serán analizados para evaluar supuestos y continuar con análisis paramétricos o no paramétricos que permitan calcular si existe diferencia significativa entre tratamientos con un valor de significancia de $p < 0.05$. Idealmente, se realizarán Anova de una vía o de dos vías con análisis post-hoc de Bonferroni y análisis de correlación de Pearson. Se utilizará el software Graph Pad Prism.

OE2. Caracterizar el perfil fitoquímico de polifenoles del extracto estandarizado rico en polifenoles totales y en antocianinas, obtenido de plantas de fresa.

2.1.1. Optimización del método de extracción de polifenoles totales y de antocianinas a partir de plantas de fresa (seleccionadas del OE1). Se compararán los rendimientos (mg polifenoles totales/g peso seco) respecto a: método de secado del material vegetal y del extracto (se comparará entre liofilización y desecador a 40°C), proporción hidroalcohólica del solvente (comparación entre diferentes proporciones de etanol, 50%, 70%, 100%), técnica de extracción (maceración vs. infusión), extracción a temperatura ambiente vs extracción a 40°C , y extracción durante 4, 8 y 24 h. Se realizarán 3 repeticiones de cada variación en el método y se seleccionará el método que permita obtener estadísticamente un mayor rendimiento y mayor repetibilidad en términos de extracción de polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu). Se utilizará un control interno de ácido gálico.

2.1.2. Preparación de extractos estandarizados respecto al contenido de polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu) y el contenido de cianidina-3-glucósido (HPLC). Se utilizará el método estandarizado y los parámetros de rendimiento obtenidos en 2.1.1. para preparar tres lotes de extracto de fresa de al menos 50 mg cada uno, con su contenido de polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu) y el contenido de cianidina-3-glucósido (HPLC) determinado.

2.1.3. Análisis de composición proximal de los extractos estandarizados ($n = 3$). Se enviarán muestras de cada uno de los 3 lotes de extracto estandarizado (preparado en 2.1.2.) al CEQUIATEC para realizar su análisis de composición proximal: humedad, grasa, cenizas, fibra, carbohidratos solubles y proteína.

2.2.1. Cuantificación del contenido de catequina, quercetina, kaempferol y ácido elágico en el extracto estandarizado de plantas de fresa ($n = 3$) por HPLC-UV y HPLC-DAD. Se contratarán los servicios del Cenibiot o del Ciprona para analizar muestras de cada uno de los 3 lotes de extracto estandarizado (preparado en 2.1.2.) y determinar su contenido de algunos polifenoles, seleccionados por su potencial antioxidante: catequina, quercetina, kaempferol y ácido elágico.

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

2.2.2. Purificación, identificación y cuantificación del contenido de antocianinas en el extracto estandarizado de plantas de fresa, mediante HPLC-MS. La purificación de las antocianinas será realizada mediante extracción de fase sólida utilizando cartuchos C18 Sep-Pak Cartridge de Waters con 360 mg de adsorbente, realizando lavados con agua acidificada con 0,10% HCl y acetato de etilo para la eliminación de azúcares y polifenoles, la elución se realizará con metanol/0,01% HCl. El eluyente que contiene las antocianinas será evaporado en un sistema RVC 2-18 CDplus (de la Escuela de Química) y el residuo será almacenado a -70°C hasta su posterior uso [30]. Las antocianinas serán identificadas mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución utilizando el equipo disponible en la Escuela de Química (Xevo G2-XS QToF Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer, Waters Corporation, Wilmslow, UK). Utilizando una columna C18 y un gradiente de metanol/H₂O con 0,1% ácido fórmico, se realizará la separación cromatográfica, mientras que el instrumento se configurará para realizar mediciones en modo positivo utilizando el método de medición de MSⁿ obteniéndose masas exactas y fragmentación de los compuestos presentes. Las mediciones se analizarán utilizando el software Progenesis QI para hacer la elucidación de las estructuras y la confirmación de los compuestos presentes en los extractos, se generarán bases de datos con las posibles estructuras de las antocianinas de interés y se utilizarán bases de datos disponibles para realizar la adecuada identificación [31]. Las antocianinas identificadas serán cuantificadas utilizando LC-HRMS, utilizando el mismo método cromatográfico que para la identificación y en modo de medición MS-full scan, optimizando la intensidad de la señal y mediante calibración externa con disoluciones de los estándares de las antocianinas de interés. Esto se realizará mediante una pasantía de la investigadora Karla Salas, becada del doctorado DOCINADE, en el CINVESTAV, México, con el Dr. Jorge Molina.

OE3. Evaluar el potencial bioactivo (citotoxicidad en células de piel, potencial regenerativo en modelos de piel in vitro, y capacidad fotoprotectora) del extracto de fresa estandarizado.

3.1. Determinación de la citotoxicidad (IC₅₀, mg/ml extracto, método de MTT) del extracto estandarizado en células de piel (fibroblastos 3T3, queratinocitos HaCaT y células de melanoma). Se cuantificará la viabilidad celular en células de piel de tres líneas celulares tratadas con 5 concentraciones crecientes del extracto estandarizado de fresa en términos de su concentración de cianidina-3-glucósido disuelto en medio de cultivo celular, siguiendo los protocolos estándar ya establecidos en el CIB para análisis de MTT. Se realizarán 3 repeticiones con 5 réplicas de cada concentración con cada línea celular; a partir de los datos se prepararán gráficos de dispersión (concentración vs viabilidad celular), y a partir de la ecuación lineal se calculará la concentración inhibitoria media (IC₅₀). Se aceptarán solamente gráficos con un r cuadrado superior a 0.97. Se comparará la IC₅₀ obtenida entre líneas celulares para determinar la línea celular que muestre mayor sensibilidad al extracto.

3.2. Determinación del efecto regenerativo del extracto estandarizado en modelos de piel in vitro. Se evaluará la tasa de migración celular en mm/día en cultivos de células 3T3 y HaCaT en monocapa en ensayos de scratch wound healing según el método ya establecido en el CIB utilizando una dosis no citotóxica del extracto según los resultados de citotoxicidad obtenidos de la actividad 3.1. y se comparará con controles no tratados. También se evaluará la queratinización de epitelios de HaCaT cultivados sobre una dermis de colágeno (según protocolo ya establecido en el CIB) tratados con una concentración no citotóxica del extracto,

6

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

y se comparará con controles no tratados mediante histología patológica (contratación de servicios para láminas histológicas teñidas con hematoxilina-eosina). Se realizarán 3 repeticiones de cada experimento y de sus respectivos controles. Las diferencias se evaluarán estadísticamente (datos numéricos) en un análisis de punto final y representación fotográfica.

3.3. Comparación del efecto fotoprotector del extracto estandarizado en un modelo de piel in vitro. Se tratará un modelo de piel in vitro tratado por 30 min con UVB/UVA (protocolo establecido en el CIB) en presencia y ausencia del extracto (dosis no citotóxica) y se evaluará mediante histología patológica (contratación de servicios para láminas histológicas teñidas con hematoxilina-eosina). También se evaluará la citotoxicidad (IC50, método MTT) de queratinocitos tratados por 30 min con UVB/UVA en presencia y ausencia del extracto (dosis no citotóxica). Se realizarán 3 repeticiones de cada experimento y de sus respectivos controles. Las diferencias se evaluarán estadísticamente (datos numéricos) en un análisis de punto final.

3.4. Determinación del efecto antioxidante del extracto mediante la prueba de DPPH. Se utilizará el protocolo ya establecido de rutina en el CIB.

OE4. Desarrollar una formulación natural de uso tópico a base del extracto estandarizado de fresa rico en antocianinas.

4.1. Elaboración de una formulación de uso tópico. Preparación de una crema, gel, o ungüento a base del extracto estandarizado, empleando aceites y grasas naturales y surfactantes de grado alimenticio. Para esto se contará con las recomendaciones de la Dra. Fernanda Vilela (Brazil).

4.2. Pruebas de inocuidad microbiológica y toxicológica. Se enviarán muestras de la formulación para verificar el contenido de antocianinas (HPLC, Cenibiot), para evaluar la ausencia de contaminantes microbianos (CEQIATEC), y para evaluar la inocuidad toxicológica (contratación de servicios).

3. El interesado no podrá transferir a terceras personas, con o sin fines comerciales, los organismos ni los materiales estipulados en el Resuelve Primero punto 1 de la presente resolución, ni su descendencia, sus partes, productos, subproductos, duplicados, biota asociada, todos sus derivados, copias de ácidos nucleicos, ni residuos, sin la autorización previa de la Oficina Técnica de la CONAGEBIO, excepto a los destinos especificados en el Resuelve Primero punto 7. Así mismo, el interesado no podrá utilizar ninguno de los elementos mencionados anteriormente, para otra metodología diferente a la estipulada en el Resuelve Primero punto 2 de la presente resolución, sin que se le solicite permiso a la Oficina Técnica de la CONAGEBIO.

4. Sitios de acceso:

Este permiso es válido para el acceso a los elementos de la biodiversidad autorizados únicamente en el inmueble inscrito en el Registro Público de la Propiedad, mediante el número de folio real 3-00011645, Finca 267261 de Agrocarico Sociedad Anónima Cédula jurídica 3-101-367837. Dueño del invernadero Minor Fernández Monge, cédula 3-0258-0164,

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

ubicado en Llano Grande de Cartago, 500 metros norte de la Casa del Pueblo, Costa Rica, Cartago, Central, Llano Grande. De conformidad con la Guía Técnica se autoriza un máximo de 6 ingresos.

5. El Interesado deberá cumplir con lo estipulado en el artículo 7 de las Normas Generales de Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad, respecto a los procedimientos que se aplican cuando se produce un cambio en el tipo de permiso de acceso asignado, informando de manera oportuna de este cambio a la Oficina Técnica de la CONAGEBIO y cumpliendo con los requisitos específicos del respectivo permiso.

6. Los funcionarios de la Oficina Técnica o los miembros de la CONAGEBIO, podrán realizar inspecciones, toma de muestras en los lugares donde se realiza la investigación y solicitar cualquier tipo de información técnica o administrativa que requieran para la verificación, el seguimiento y control del permiso otorgado.

7. En el contrato para el otorgamiento del consentimiento previamente informado, se establece como destino de las muestras: El material a trabajar será previsto en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. En caso de que el interesado envíe las muestras a establecimientos que se contraten para realizar análisis por medio de venta de servicios, los remanentes de las muestras deben ser destruidos, de manera que en dichos establecimientos no se almacene ningún resto de las muestras después de finalizado el análisis correspondiente.

8. Todos los colaboradores científicos involucrados en el proyecto, se encuentran igualmente obligados con El Proveedor, conforme a los mismos términos establecidos en el contrato de CPI. Asimismo, El Interesado se compromete a comunicar y a velar porque dichos colaboradores científicos cumplan con lo convenido en el contrato de CPI.

9. En el caso de que se obtuvieren algún tipo de beneficio científico en el corto, mediano o largo plazo, de algún producto o subproducto derivado de la utilización de las hojas de plantas de fresa (Fragaria x ananassa, variedad Festival) adquiridos según los términos de este contrato, el Interesado y terceros involucrados se comprometen a compartirlos con el Proveedor, mediante intercambio de información, transferencia tecnológica o capacitación en un plazo menor a un año luego de concluida la vigencia del proyecto en el ITCR.

No obstante, lo anterior, si eventualmente los resultados del presente proyecto de investigación condujeren a la generación de información con valor comercial para el Interesado o para terceros, como en el caso de eventuales licenciamientos y/o la obtención posterior de cualquier tipo de producto comercializable, ya fuere a nivel local o internacional, que representen beneficio económico o material para el Interesado.

10. En cumplimiento del artículo 13 de las Normas Generales de Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad, el Interesado deberá entregar un informe de colecta una vez finalizada la etapa de muestreo y un informe final al vencimiento de esta Resolución, así como copias de los artículos científicos y publicaciones que se deriven de ellos a la Oficina Técnica de la CONAGEBIO y al Proveedor. Se deberá cumplir con lo establecido en la legislación vigente, artículos 30 y 31 del Decreto Ejecutivo 31514 y sus reformas, respecto al contenido mínimo de dichos informes.

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

11. De conformidad con el CPI, el Interesado se compromete a darle al Proveedor un informe final y copia de todas las comunicaciones científicas (artículos, conferencias, capacitaciones) y comunicaciones en medios masivos (periódicos, medios noticieros) que se realicen producto del proyecto. Esta información se le brindará al Proveedor una vez finalizado el proyecto.

12. De conformidad con el CPI, las partes establecen los siguientes términos acordados sobre el protocolo de preparación del extracto rico en polifenoles de hojas de plantas de fresas (Fragaria x ananassa, variedad Festival).

1. El ITCR ejercerá los derechos patrimoniales sobre las invenciones producto de la actividad académica.
2. El ITCR compartirá los resultados con el proveedor por medio de una charla.
3. ITCR es propietario de los datos de marcha fitoquímica, extracciones, capacidad antioxidante, actividad citotóxica (viabilidad celular) y actividad proliferativa/regenerativa y fotoprotectora en modelos de piel in vitro de hojas de plantas de fresas (Fragaria x ananassa, variedad Festival) generadas en este proyecto, y por tanto será el autor principal de cualquier publicación, y hará mención del lugar de donde fue obtenido el producto en la misma.

13. El Interesado se compromete a pagar al Proveedor 1500 colones por muestra extraída.

14. El Interesado se compromete a dar constancia del origen de fresas (Fragaria x ananassa, variedad Festival) en cualquier publicación, trámite o comunicación que se haga del proyecto de investigación.

El Interesado se compromete a mencionar al Proveedor y a Costa Rica como país de origen de las muestras, en cualquier publicación, informe, presentación, trámite u otro uso posterior que se les dé, incluyendo su eventual comercialización y la de sus derivados.

15. Los recursos de la biodiversidad a ser colectados, según se describe en el Resuelve Primero punto 1, no podrán ser objeto de protección de derechos de propiedad intelectual e industrial, de conformidad con el artículo 78 de la Ley de Biodiversidad No 7788 de Costa Rica y sus reformas.

16. El Interesado deberá citar el número de la Resolución de la Oficina Técnica de la CONAGEBIO que autorice el acceso, en cualquier presentación, artículo científico, publicación u otro uso que se le dé.

17. El Interesado no podrá enajenar el permiso otorgado, pues el mismo es personal e intransferible, está limitado materialmente a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos autorizados y sólo podrá ser utilizado en el área o territorio indicado en el Resuelve Primero punto 6.

Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)

18. En caso de exportación de muestras, el Interesado deberá cumplir con las obligaciones que estipula la legislación nacional, tal como lo indica el artículo 18 de las Normas Generales para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad.

19. Si existieran convenios y/o contratos y/o acuerdos de transferencia de material, establecidos con las instituciones participantes en el proyecto de investigación o con cualquier persona física o jurídica, nacionales o extranjeras, el Interesado deberá presentarlos ante la Oficina Técnica, cumpliéndose con lo establecido en el artículo 74 de la Ley de Biodiversidad y el artículo 22 de las Normas Generales para el Acceso para los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad. El Interesado no podrá transferir a terceros, el material original, ni duplicados o sus derivados, sin la previa autorización de la Oficina Técnica y en caso de que el convenio o/y contrato o/y acuerdo de transferencia de material, no sea presentado ante la Oficina Técnica para su debida autorización, se cancelará el permiso otorgado.

20. Los acuerdos y/o convenios y/o acuerdos de transferencia de material, deberán ser remitidos a la Oficina Técnica, de acuerdo a la cláusula anterior de esta resolución y deberá adjuntarse además un tanto en idioma español.

SEGUNDO: Se autoriza a Karla Salas Arias, con cédula de identidad número 113300011 y a Laura Andrea Calvo Castro, con cédula de identidad número 111980353 para que ingresen a los sitios autorizados a coleccionar las muestras.

TERCERO: Se autoriza la participación en este proyecto a Laura Andrea Calvo Castro, con cédula de identidad número 111980353 como investigador principal y a Karla Salas Arias, con cédula de identidad número 113300011; Andrés Sánchez Kopper, con cédula de identidad número 110500202; Ana Abdelnour Esquivel, con cédula de identidad número 700600297 como colaborador científico, a quienes corresponden las mismas obligaciones y derechos derivados del Consentimiento Previamente Informado y la presente resolución de otorgamiento de permiso.

CUARTO: La Oficina Técnica se reserva el derecho de cancelar este permiso sin responsabilidad alguna, cuando se demuestre que se ha incumplido con lo establecido en esta resolución, con los acuerdos del CPI o con alguna disposición de la Ley de Biodiversidad o sus Reglamentos. Lo anterior previo cumplimiento del procedimiento administrativo establecido en el Reglamento para la aplicación de sanciones administrativas en materia de acceso no autorizado a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos establecidos en la Ley de Biodiversidad. No. 7788, Decreto Ejecutivo No.39341-MINAE.

QUINTO: De conformidad con el consentimiento previamente informado, el formulario de la Guía Técnica previamente remitidos a la Oficina Técnica y los artículos 70 de la Ley de Biodiversidad y 23 del Decreto Ejecutivo 31514-MINAE, el presente permiso de acceso se otorga por un plazo de 36 (treinta y seis) meses, contados a partir del día siguiente de su notificación.

SEXTO: En el caso de disconformidad, contra esta resolución tienen lugar los recursos ordinarios de revocatoria ante la Oficina Técnica y apelación ante la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, dentro de los tres días hábiles siguientes a la notificación de la presente resolución.



**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

SÉPTIMO: NOTIFÍQUESE.

ANGELA
GONZALEZ
GRAU (FIRMA)

Firmado digitalmente
por ANGELA GONZALEZ
GRAU (FIRMA)
Fecha: 2022.03.31
17:07:36 -06'00'

**M.Sc. Angela González Grau.
Directora Ejecutiva
Oficina Técnica, CONAGEBIO**

GRETTEL
CESPEDES ARIAS
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
GRETTEL CESPEDES ARIAS
(FIRMA)
Fecha: 2022.03.31 10:15:56
-06'00'

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

Anexo 3. Artículo 1 (publicado)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. (p. 55-68)
<https://doi.org/10.23850/24220582.4875>



OPEN ACCESS



Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

Bioactive potential of strawberry crop residues (*Fragaria x ananassa*) in Costa Rica

Karla Melissa Salas-Arias¹

Bridget Salas-Morgan²

Laura A. Calvo-Castro³

¹Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica. Universidad Nacional. Universidad Estatal a Distancia ksalas@itcr.ac.cr

²Instituto Tecnológico de Costa Rica bridgetsalasm@gmail.com

³Instituto Tecnológico de Costa Rica ancalvo@itcr.ac.cr

Recibido: 13/06/2022 Aceptado: 16/06/2022

Resumen El fruto de la fresa (*Fragaria x ananassa*) es un alimento ampliamente consumido a nivel mundial, y al cual se le han atribuido una amplia gama de propiedades beneficiosas para la salud humana, mayoritariamente asociadas a su potencial antioxidante. La búsqueda de fitoquímicos bioactivos en la fresa se ha enfocado en el fruto, mientras que el perfil bioquímico de las hojas ha sido poco estudiado y sigue siendo poco aprovechado, a pesar de constituir una fuente potencial de metabolitos bioactivos que podrían ser utilizados en la formulación de productos para el sector alimenticio, industrial y farmacéutico. Además, se ha reportado mayor contenido de polifenoles bioactivos en las hojas de fresa que en el fruto, y las hojas de fresa podrían ser una fuente importante de ácido elágico, un compuesto antioxidante bioactivo poco abundante en la dieta humana pero de gran potencial biomédico. Este artículo de revisión bibliográfica tiene como objetivo evaluar las características del cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica, con miras al aprovechamiento integral de los residuos agroindustriales de este cultivo. La información consultada demostró que la comercialización del cultivo de fresa se enfoca en el fruto, mientras que las hojas y el resto del material vegetativo de la planta se descartan periódicamente, y podrían ser incorporados en nuevas cadenas productivas. Este tipo de estrategias son de especial importancia para países pequeños en desarrollo y con economías de base agrícola, para mejorar el aprovechamiento de los residuos agroindustriales y darles un mayor valor agregado a los cultivos, en beneficio del ambiente y la salud humana.

Palabras clave: economía circular, fresa, hoja, polifenoles, agroindustria.

Abstract Strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) is a widely consumed food worldwide and has been characterized to have a wide range of beneficial properties for human health, mostly associated with its antioxidant potential. The search for bioactive phytochemicals in strawberry has focused mainly on the fruit, while the biochemical profile of the leaves has been little studied and continues to be underutilized, despite being a potential source of bioactive metabolites that could be used in the formulation of food, industrial and pharmaceutical products. In addition, higher bioactive polyphenol content has been reported in strawberry leaves than in the fruit, and strawberry leaves could also be an important source of ellagic acid, a bioactive antioxidant compound, which is limited in the human diet but has great biomedical potential. This literature review aims to evaluate the information available on the characteristics of strawberry crops (*Fragaria x ananassa*) in Costa Rica, targeting towards the comprehensive use of the agro-industrial residues of this plant. The information reviewed confirmed that the commercialization of strawberry cultivation focuses on the fruit, while the leaves and the rest of the plant's vegetative material are discarded periodically, but could be incorporated into new production chains. Such strategies are especially important for small developing countries with agricultural-based economies, to improve the use of agro-industrial waste and provide added value to crops, aiding both the environment and human health.

Keywords: circular economy, strawberry, leaf, polyphenols, agroindustry.

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. [p.55-68]

Introducción

Las economías circulares buscan optimizar el uso de los recursos, extender su vida útil y minimizar la generación de residuos. Esto se hace a través de criterios de reutilización, re-fabricación, reciclaje y revalorización de residuos en nuevos procesos productivos (Toop *et al.*, 2017). La recuperación de fitoquímicos bioactivos a partir de desechos agroindustriales ofrece la posibilidad de convertirlos en ingredientes naturales innovadores de alto valor, que pueden ser incorporados en diversas cadenas productivas.

Diversos estudios han demostrado el potencial antioxidante y los beneficios de la fresa (*Fragaria x ananassa*) para la salud humana (Afrin *et al.*, 2016; Basu *et al.*, 2014; Fierascu, *et al.*, 2020; Forbes-Hernandez *et al.*, 2016; Giampieri *et al.*, 2017, 2015; Golovinskaia y Wang, 2021; Miller *et al.*, 2019). Sin embargo, la búsqueda de fitoquímicos bioactivos en la fresa se ha enfocado mayoritariamente en el fruto, mientras que el perfil fitoactivo de sus hojas ha sido poco estudiado, a pesar de que se ha evidenciado que las hojas de las fresas son más ricas en compuestos polifenólicos bioactivos que la pulpa del fruto (Kärlund *et al.*, 2017, 2014; Michalska *et al.*, 2017).

Aunado a esto, en el cultivo tradicional de fresa, la sección vegetativa se descarta de forma periódica, con lo que se desaprovecha materia prima de alto potencial biotecnológico (Barquero *et al.*, 2007; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2017; Sato *et al.*, 2019). Por lo tanto, esta revisión bibliográfica se enfoca en describir las características del cultivo de fresa en Costa Rica, con miras al aprovechamiento integral del potencial bioactivo de sus residuos vegetativos.

Metodología

Para esta revisión exhaustiva de literatura, se utilizaron los motores de búsqueda Google Académico, Pubmed, y Science Direct. Los

términos de búsqueda (en inglés) fueron “fresa”, “*Fragaria*”, “*Fragaria x ananassa*”, “hoja”, “polifenoles”, “extractos”, y “residuos”. Se seleccionaron las publicaciones de los últimos 10 años, y se amplió el período de búsqueda para algunos contenidos específicos relevantes (“descripción botánica”, “cultivo”, “Costa Rica”). Se excluyeron las publicaciones en idiomas distintos al inglés y español, los reportes de otras especies de fresa (excepto algunas menciones relevantes respecto a *Fragaria vesca*), y los documentos de enfoque estrictamente microbiológico, fitopatológico, y genético. Del total de 180 publicaciones científicas o técnicas compiladas, se seleccionaron los 78 documentos consultados en esta revisión.

La literatura fue administrada mediante Mendeley. Para la comparación del contenido de polifenoles en variedades de *Fragaria x ananassa* se consideraron solamente las variedades más relevantes para Costa Rica.

Las estadísticas respecto a la producción mundial de fresa se consultaron en FAOStat. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2021), en la sección de “cultivos y productos de ganadería”, con los criterios de búsqueda “todos los países”, “producción-cantidad”, “fresa-cultivos primarios”, y “2020”. El porcentaje de producción de los países mencionados en este artículo se calculó respecto al total mundial.

Resultados y discusión

Cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*): Descripción botánica

El género *Fragaria* (familia *Rosaceae*) incluye más de 20 especies distribuidas en todo el mundo, que pueden ser diploides, tetraploides, hexaploides y octaploides, a partir de un genoma haploide de 7 cromosomas (Palei *et al.*, 2015; Staudt, 1999, 2009). Las plantas de fresa (Figura 1) se reproducen asexualmente mediante estolones o apomixis, o sexualmente por autogamia o alogamia (Marta *et al.*, 2004).

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa
(*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

Las especies diploides suelen ser autoincompatibles, mientras que las poliploides pueden ser autofecundables (Marta *et al.*, 2004). Algunos autores separan las variedades de fresa en tipos de día-largo, día-corto, o día-neutral.

Sin embargo, esta clasificación no debe ser considerada estándar, ya que no solamente el fotoperíodo influye en el crecimiento vegetativo y la floración, sino que también intervienen otros factores tales como humedad y temperatura (Massetani *et al.*, 2011; Warner *et al.*, 2021).

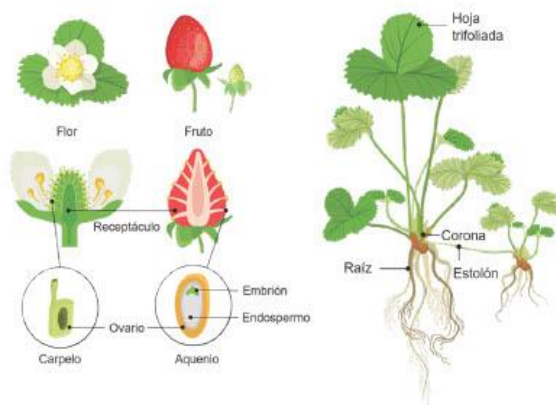


Figura 1

Principales estructuras anatómicas de la planta de fresa

Nota. Adaptado de la descripción de Liu *et al.* (2020) y Demchak (2013).

Hojas y tallo. La fresa moderna cultivada (*Fragaria x ananassa* Duschene, $2n = 8x = 56$) es una planta perenne, herbácea, con tallos rastreros, y hojas trifoliadas (Liston *et al.*, 2014; Staudt, 1999). Las plantas de fresa presentan un tallo comprimido (corona) a partir del cual crecen (en forma de roseta) las hojas, estolones, inflorescencias y nuevas coronas (Demchak, 2013). La propagación vegetativa ocurre a partir de los estolones (Demchak, 2013).

Flor. Las especies de la familia *Rosaceae* usualmente presentan flores con cinco sépalos, cinco pétalos y numerosos estambres (Liu *et al.*, 2020). En la fresa, los pétalos rodean de 20 a 35 estambres, cada uno conformados por un filamento y una antera (Demchak, 2013). La flor es una inflorescencia, compuesta por un tallo engrosado llamado receptáculo (Liu *et al.*, 2020), el cual está cubierto por hasta

500 pistilos, en cuyas bases se encuentran los ovarios (Demchak, 2013). La inflorescencia crece en el extremo apical de la corona de hojas, y la floración es inducida principalmente al aumentar la temperatura (entre 15 °C y 30 °C), con influencia del fotoperíodo (Massetani *et al.*, 2011). Las inflorescencias de *F. x ananassa* son cimas, con flores hermafroditas, de simetría radial con cinco o seis pétalos, usualmente de color blanco con posibles tonos color rosa (Liston *et al.*, 2014; Staudt, 1999).

Fruto. La parte carnosa del fruto de fresa surge del engrosamiento del receptáculo floral, mientras que los múltiples carpelos se convierten en achenios secos, que contienen el embrión (Liu *et al.*, 2020). Por ello, no es una verdadera baya, sino un agregado accesorio, donde las semillas (de aproximadamente 1 mm de largo) son el verdadero fruto de la

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. [p.55-68]

especie (Fait et al., 2008; Demchak, 2013). Cada receptáculo diferenciado contiene varios centenares de semillas (aquenios), embebidas en su epidermis (Fait et al., 2008). El desarrollo es principalmente inducido por la liberación de auxinas desde los aquenios fecundados (Fait et al., 2008).

Sistema Radicular. Las plantas de fresa tienen un sistema radicular fibroso y relativamente superficial (entre 15 a 30 cm de profundidad), por lo cual requieren ser protegidas de la desecación (Demchak, 2013).

Variedades. Existen numerosas variedades de fresa que se cultivan a nivel mundial. En Costa Rica (Tabla 1), la más cultivada reportada para el 2007 fue Oso Grande (Barquero et al., 2007). Sin embargo, según el Programa de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria-Fresa de Costa Rica [PITTA-Fresa] (2022), las variedades más cultivadas

actualmente en el país son San Andreas (53%), Festival (26%), Albión (23%), Oso Grande (3%), Cabrillo (2%), Portola (1%), Rubillen (1%) y Real (1%). También se ha reportado en Costa Rica el cultivo de Camino Real, Elyana (IICA, 2017), Tioga, Douglas, Chandler, Brighton, y Selva (Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica [MAG], 2014). Se refleja la gran variabilidad y flexibilidad de opciones del cultivo.

Cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*): Aspectos agronómicos

La fresa moderna comercial (*F. x ananassa*) está adaptada para el cultivo en múltiples condiciones agrícolas y climáticas, aunque principalmente se produce en clima templado y subtropical, con temperaturas idóneas de 22 °C a 25 °C durante el día, y de 7 °C a 13 °C durante la noche (Saroj et al., 2021). La floración se inhibe a temperaturas superiores a los 26 °C; por lo tanto, en las regiones tropicales, el cultivo de la fresa sólo es viable comercialmente en zonas altas más frías (Warner et al., 2021).

Tabla 1

*Contenido de azúcares y polifenoles reportados en el fruto de variedades de fresa (*Fragaria x ananassa*) de interés comercial para Costa Rica*

Parámetro*	Tioga	Douglas	Chandler	Selva	Festival	Albión	San Andreas	Oso Grande	Elyana	Camino Real	Referencia
Azúcares											(Kumari et al., 2020; Nunes et al., 2021; Urün et al., 2021)
Totales (%)	5,07	5,8	6,62	6,50	7,25 ± 0,33	-	-	-	6,70	7,65 ± 0,07	
Totales (mg g ⁻¹)	-	-	4,25 ± 1,96	-	11,03 ± 1,97	16,15 - 42,42	40,56	47,2 - 58,8	-	-	(Cordenunsi et al., 2003; Paparozzi et al., 2018; Ruan et al., 2013)b
Glucosa (g 100 g ⁻¹)	-	-	-	1,55	1,6	1,99 - 15,51	2,7 - 14,42	1,7	1,84	-	(Oguz et al., 2017; Omelas-Paz et al., 2013; Pinheiro et al., 2021; Ruan et al., 2013)
Fructosa (g 100 g ⁻¹)	-	-	-	1,95	1,6	2,18 - 19,18	3,7 - 17,43	1,3	2,15	-	(Oguz et al., 2017; Omelas-Paz et al., 2013; Pinheiro et al., 2021; Ruan et al., 2013)

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa
(*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

Parámetro	Tioga	Douglas	Chandler	Selva	Festival	Albiñ	San Andreas	Oso Grande	Elyana	Camino Real	Referencia
Sacarosa (g 100 g ⁻¹)	-	-	-	-	-	1,89 – 7,73	8,71	-	1,02	-	(Oguz <i>et al.</i> , 2017; Ruan <i>et al.</i> , 2013)
Polifenoles totales (mg EAG g ⁻¹)	-	0,77	1,67 ± 0,15	0,92 – 1,36	0,91 – 3,11	1,10 – 2,88	2,57 – 3,15	3,24	-	1,40 ± 0,00	(Kobi <i>et al.</i> , 2018; Lema- Rumińska <i>et al.</i> , 2021; Nunes <i>et al.</i> , 2021; Ornelas-Paz <i>et al.</i> , 2013; Paparozzi <i>et al.</i> , 2018; Pinheiro <i>et al.</i> , 2021; Singh <i>et al.</i> , 2011; Urün <i>et al.</i> , 2021)
Flavonoides											
(mg EC g ⁻¹)	-	-	0,58 ± 0,07	-	0,36 ± 0,07	0,44 ± 0,07	-	-	-	-	(Paparozzi <i>et al.</i> , 2018; Pinheiro <i>et al.</i> , 2021)
(mg EQ g ⁻¹)	-	-	-	-	2,32	1,56	2,09	1,64	-	-	
Antocianinas											
(mg ECG g ⁻¹)	-	0,57	1,04	0,65	0,99	0,16 – 0,62	-	-	-	0,22 ± 0,00	(Carvalho <i>et al.</i> , 2021; Chaves <i>et al.</i> , 2017; Kobi <i>et al.</i> , 2018; Lema- Rumińska <i>et al.</i> , 2021; Nunes <i>et al.</i> , 2021; Nunes <i>et al.</i> , 2005; Singh <i>et al.</i> , 2011)
(mg EPG g ⁻¹)	-	-	-	-	-	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,02	1,65	-	0,16 ± 0,04	
(mg g ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	0,52	-	-	-	

Nota. a. EAG: equivalentes de ácido gálico; EC: equivalentes de catequina; EQ: equivalentes de quercetina; ECG: equivalentes de cianidina-3-glucósido; EPG: equivalentes de pelargonidina-3-glucósido. b. Se evaluaron plantas en tres condiciones ambientales (invierno, primavera y verano), se muestra sólo la mayor concentración obtenida. Elaboración propia.

En Costa Rica, un país tropical (8° 02' – 11° 13' N) con condiciones de menos de 12 horas de luz diaria, la zona más apta para la producción de fruto se encuentra entre los 1300 y 2000 m.s.n.m. con temperaturas entre 10 °C a 20 °C (Barquero *et al.*, 2007). El Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica recomienda el cultivo en suelos livianos, preferiblemente arenosos y con buen drenaje, con pH entre 5,5 y 6,5, así como sembrar en los primeros meses de la época lluviosa (mayo, junio y julio) y cosechar en los primeros meses de la época seca (noviembre y diciembre), con lo cual se pueden reducir problemas fitosanitarios causados por humedad, y se coincide con las fechas de mejor precio en el mercado internacional (Barquero *et al.*, 2007).

La fresa es usualmente cultivada en ambientes controlados, bajo condiciones de iluminación y temperatura reguladas (Warner *et al.*, 2021). En las zonas altas de Costa Rica (Figura 2), principalmente mediante sistemas de “ambiente protegido” de elaboración propia, con coberturas de suelo (eras recubiertas por plástico), de aire (túnel y macrotúnel), y con sistemas de riego por goteo (Barquero *et al.*, 2007).

Se recomienda sembrar en eras de 0,70 m de ancho y 0,40 m de alto (0,35 cm entre eras), con dos hileras por era (0,35 m entre hileras, y 0,30 m entre plantas), y no más de 40 m de largo por era (IICA, 2017). También, en sistemas

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. [p.55-68]

hidropónicos (Saroj *et al.*, 2021), mediante el uso de sustratos orgánicos e inorgánicos y medios de cultivo especializados, con buenos resultados (Imran *et al.*, 2022).

La propagación tradicional de la fresa comercial (*F. x ananassa*) se realiza mediante multiplicación por estolones. Sin embargo, esta técnica implica alta vulnerabilidad a agentes patológicos, lo cual puede causar pérdidas de hasta el 50% de la producción (Ruíz *et al.*, 2018). Las plantas obtenidas mediante técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* son más costosas que las obtenidas por técnicas convencionales (Palei *et al.*, 2015). No obstante, la micropropagación *in vitro* ha permitido la producción masiva de plantas de fresa con alta homogeneidad genética y con características mejoradas, tales como períodos de propagación más cortos, mayor cantidad de flores y de rendimiento de frutos por hectárea, más estolones por plantas,

superior resistencia y tolerancia a factores de estrés biótico y abiótico, y mayor vigor (Ruíz *et al.*, 2018).

Se han reportado múltiples protocolos eficientes para la micropropagación y la regeneración *in vitro* de la fresa a través de organogénesis adventicia o embriogénesis somática, con diversos tipos de explantes tales como hoja, tallo, pedúnculos, estolones, estípulas, tallos rastreros, raíces, anteras, embriones, sépalos, protoplastos, y peciolo (Husain *et al.*, 2011). El explante preferido para la multiplicación ha sido el cultivo de meristemos de ápices de los estolones, en medios con alta concentración de citoquinina y bajos niveles de auxinas, lo cual promueve la brotación axilar (Husain *et al.*, 2011; Palei *et al.*, 2015). Las técnicas *in vitro* también han facilitado variabilidad respecto al contenido de compuestos bioactivos (Palei *et al.*, 2015).

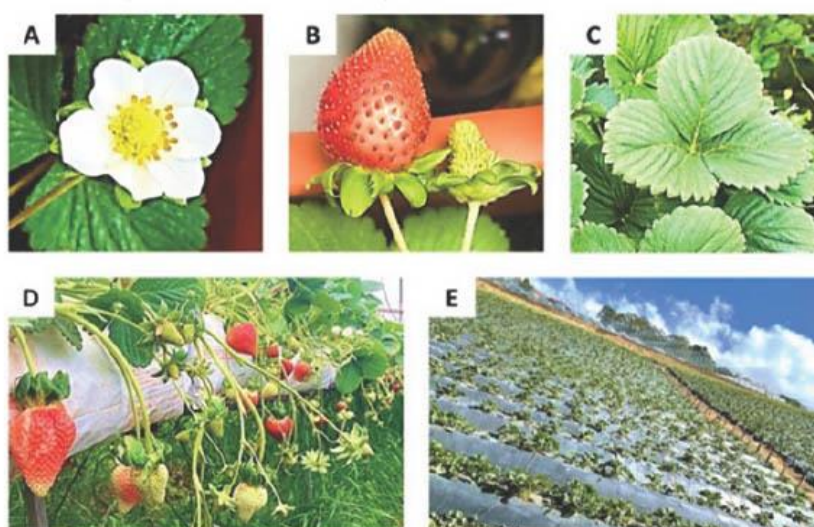


Figura 2

Cultivos de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) en Llano Grande, Cartago, Costa Rica

Nota. A. Flor. B. Fruto. C. Hoja. D y E. Cultivos en invernadero y en campo, respectivamente. Se ha reportado que las hojas de la variedad Festival tienen mayor contenido de polifenoles totales en comparación con otras variedades. Elaboración propia.

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa
(*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

Cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*): Aspectos económicos

La producción global de fresa se ha triplicado en las últimas dos décadas. Para el 2020, la FAO reportó 12,2 millones de toneladas de fresa cultivada en 79 países, donde la mayor producción se realizó en China (27,3%), seguida por Estados Unidos (8,7%), Egipto (4,9%), México (4,6%), Turquía (4,5%) y España (2,2%) (FAO, 2021). Más del 95% se realiza en el Hemisferio Norte (Kim *et al.*, 2011).

En Costa Rica, el VI Censo Nacional Agropecuario (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2015) menciona la existencia de 342 fincas dedicadas a este cultivo en Costa Rica para el 2014, con una extensión total de 227,3 hectáreas de área sembrada, ubicadas en las provincias de Cartago (38,6%), Alajuela (21,6%), San José (20,8%), Heredia (16,4%), y Limón (2,6%), de las cuales un 58,8% de las fincas reportaron producción para venta en el mercado local y sólo 0,9% para exportación. Por lo tanto, la mayor parte de la producción de fresa en Costa Rica se destina a los mercados y consumo local.

La fresa es comercialmente disponible en todo el mundo de forma fresca o congelada, y en alimentos procesados tales como mermeladas, néctar, y puré (Prasad *et al.*, 2022). En Costa Rica, el consumo anual de este fruto alcanzó los 3,03 kg por persona en el 2015 (Programa Integral de mercadeo Agropecuario de Costa Rica [PIMA], 2016). De forma similar, en Estados Unidos fue de 4,5 kg por persona en 2014, mientras que en la Unión Europea el consumo anual es de alrededor de 5 kg por persona (Simpson, 2018).

Aunado a lo anterior, las hojas de las frutas tipo baya han sido utilizadas medicinalmente en diversas culturas, también las hojas de varias especies de *Fragaria* (Ferlemi y Lamari, 2016; Villamil-Galindo *et al.*, 2020). Por ejemplo, las

hojas de fresa silvestre de la especie *Fragaria nubicula* se utilizan como antiséptico, laxante, diurético y astringente; para detener la diarrea y la disentería; para tratar el resfriado, la tos y la fiebre; y para aliviar dolor de oído, forúnculos, y úlceras bucales y estomacales (Roshan *et al.*, 2019). Sin embargo, el perfil fitoactivo de las hojas de fresa ha sido menos estudiado que el de fruto, y sigue siendo poco aprovechado, a pesar de constituir una fuente potencial de metabolitos bioactivos que pueden ser utilizados en la formulación de productos para el sector alimenticio, industrial y farmacéutico.

Importancia de los polifenoles en el cultivo de fresa

Los polifenoles (Figura 3) constituyen un gran grupo de fitoquímicos que comparten como característica central la presencia de al menos un grupo fenol en su estructura química (Fraga *et al.*, 2019). Estos son los principales pigmentos en frutas, vegetales y cereales. Poseen diferentes funciones en la planta, como la atracción de polinizadores, y la protección de la planta contra la radiación ultravioleta y la contaminación viral y microbiana (Fraga *et al.*, 2019).

El interés actual por los pigmentos polifenólicos se debe a su potencial bioactivo en la prevención o tratamiento de enfermedades crónicas, tales como afecciones cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad. Además, tienen efectos anti-inflamatorios y anti-neurodegenerativos. Por lo tanto, son compuestos promisorios para el desarrollo de productos de comerciales de consumo humano, con potenciales beneficios biomédicos (Forbes-Hernandez *et al.*, 2016).

El fruto de fresa contiene abundancia de compuestos antioxidantes, principalmente vitamina C (hasta 60 mg 100 g⁻¹ peso fresco) (El-Hawary *et al.*, 2021) y polifenoles, entre estos, antocianinas (responsables del color

**Ministerio de Ambiente y Energía
Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad
(CONAGEBIO)**

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio - Diciembre. [p.55-68]

rojo del fruto; primordialmente pelargonidinas y cianidinas), así como; taninos hidrolizables (e.g. elagitaninos) y condensados (e.g. proantocianidinas), flavonoles (e.g. quercetinas, kaempferol, fisetina), flavanoles (e.g. catequinas, procianidinas), y ácidos hidroxicinnámicos (e.g.

ácido cumárico, elágico, y férulico) (Aaby *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2008; Fierascu *et al.*, 2020; Van de Velde *et al.*, 2013). Además, luego de las moras y las frambuesas, las fresas representan una de las principales fuentes de ácido elágico en la dieta (da Silva *et al.*, 2008; Michalska *et al.*, 2017).

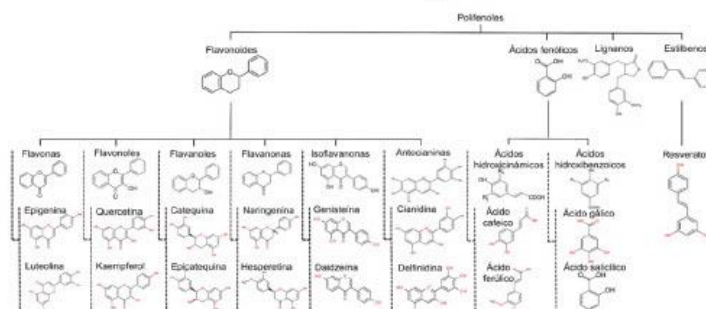


Figura 3

Principales grupos de compuestos polifenólicos presentes en plantas

Nota. Para cada subgrupo de flavonoides y ácidos fenólicos, se muestran dos ejemplos representativos (línea punteada). Elaboración propia.

El fruto objeto de revisión, está incluido dentro de las 100 fuentes alimenticias más abundantes de polifenoles, y ocupan la posición 89 dentro de los alimentos y bebidas que proveen más de 1 mg de polifenoles totales por 100 g ingeridos (Prasad *et al.*, 2022). La variabilidad y el contenido exacto de compuestos fenólicos en las distintas especies y variedades dependen de muchos factores, tales como las cualidades genéticas, las condiciones de cultivo, la madurez del fruto, el tiempo de almacenamiento y las condiciones ambientales (Aaby *et al.*, 2012; Fierascu *et al.*, 2020).

Al igual que en otras frutas tipo baya, como la mora, la frambuesa y los arándanos, se ha demostrado que las hojas de la fresa son más ricas en compuestos polifenólicos que la pulpa del fruto (El-Hawary *et al.*, 2021; Ferlemi y Lamari, 2016; Kårlund *et al.*, 2014; Michalska *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2015). Por ejemplo, El-Hawary *et al.* (2021) reportaron $62,37 \pm 0,1 \mu\text{g}$ EAG mg^{-1} de polifenoles totales y $67,1 \pm 0,4 \mu\text{g}$ equivalentes de rutina mg^{-1} de flavonoides

totales en hojas de fresa variedad Festival, en comparación con un contenido de $20 \pm 0,1 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$ de polifenoles totales y $9,52 \pm 0,2 \mu\text{g equivalentes de rutina (ER) mg}^{-1}$ de flavonoides totales en frutos de la misma variedad. Esto representa aproximadamente tres veces mayor cantidad de polifenoles totales y siete veces mayor cantidad de flavonoides totales en la hoja respecto al fruto. Algunos de los más abundantes reportados en hoja, incluyen kaempferol, quercetina, ácido clorogénico, ácido cafeico y ellagitanninos (El-Hawary *et al.*, 2021). Estos últimos se han reportado en concentraciones hasta nueve veces superiores en hoja (82 mg g^{-1} , peso seco) respecto al fruto de la fresa (Karlinska *et al.*, 2021).

Al igual que con el fruto, es esperable que el contenido polifenólico de las hojas difiera entre cultivares, sistemas de cultivo, y condiciones ambientales; por ejemplo, Villamil-Galindo *et al.* (2021) reportaron un mayor contenido de polifenoles totales en las hojas de la variedad

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa
(*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

Festival ($14,97 \text{ g EAG kg}^{-1}$) respecto a las de San Andreas ($8,93 \text{ g EAG kg}^{-1}$), y a las de Camino Real ($6,14 \text{ g EAG kg}^{-1}$). De forma similar, El-Hawary *et al.* (2021) reportaron mayor contenido de polifenoles totales ($62,37 \pm 0,1 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$) en la variedad Festival respecto a la Tamar ($42,63 \pm 0,2 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$), aunque levemente inferior a las Winter Dawn ($66,58 \pm 0,2 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$), Red Merlin ($72,1 \pm 0,1 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$) y Suzana ($72,63 \pm 0,1 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$). Sin embargo, Festival presentó mayor contenido de flavonoides totales ($67,1 \pm 0,4 \mu\text{g ER mg}^{-1}$) en hoja respecto a las demás variedades mencionadas (con valores entre $52,89 \pm 0,1$ y $65,79 \pm 0,1 \mu\text{g ER mg}^{-1}$) (El-Hawary *et al.*, 2021).

Consideraciones para la revalorización de los residuos vegetativos del cultivo de fresa en Costa Rica

Los residuos agroindustriales pueden ser revalorizados mediante diversas estrategias, entre estas, la transformación para uso como materias primas en otras cadenas productivas, la generación de combustibles y la explotación térmica. Además, algunos se emplean para la alimentación animal o se aprovechan para compostaje que se reincorpora a los cultivos agrícolas (Vargas y Pérez, 2018). Sin embargo, la mayoría de los desechos agroindustriales no son procesados o descartados apropiadamente; muchos son eliminados mediante quema o vertidos en suelos y aguas, lo que causa contaminación ambiental, con efectos nocivos para el ambiente y la salud de los organismos vivos (Vargas y Pérez, 2018).

El cultivo de fresa genera gran cantidad de residuos agroindustriales, ya que solo se emplea el fruto y el resto de la planta (hojas, cálices, tallos, y demás tejido vegetativo) no se utiliza (Villamil-Galindo *et al.*, 2020, 2021). Al ser perenne, la planta produce constantemente nuevos tallos y hojas, por lo tanto, se acumula eventualmente gran cantidad de hojarasca, lo cual favorece el aumento de humedad y

la proliferación de plagas; debido a esto, el material vegetativo viejo se poda de forma periódica, usualmente después de los ciclos de cosecha (Barquero *et al.*, 2007). Además, para renovarlo, las plantas viejas se deben arrancar completamente del suelo, con la raíz, y deben ser retiradas del campo de siembra; todo este material orgánico puede ser utilizado en compostaje, aunque se recomienda su tratamiento con fungicidas-acaricidas para el control de plagas (IICA, 2017). Hasta donde es de nuestro conocimiento, no existe en Costa Rica un método estandarizado para la eliminación de los residuos del cultivo de fresa, más allá de su utilización en compostaje o alimentación animal, lo cual implica la subutilización o pérdida potencial de compuestos bioactivos de alto valor para otras industrias.

Se ha reportado ampliamente la revalorización de los residuos del fruto de fresa no consumido y de los desechos del procesamiento industrial (Cubero-Cardoso *et al.*, 2020; Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2019; Serrano Moral, 2015; Tumbas *et al.*, 2015; Vázquez-González *et al.*, 2020). Sin embargo, los desechos vegetativos, que pueden representar hasta el 20% de la producción total, son poco aprovechados (Villamil-Galindo *et al.*, 2020, 2021).

Algunos de los efectos reportados para extractos de hoja de fresa con posibles aplicaciones biomédicas incluyen: actividad antioxidante *in vitro* (Cvetković *et al.*, 2017); inhibición de la proliferación contra células humanas de leucemia (HL60) (Skupien *et al.*, 2006), y contra células humanas de carcinoma hepatocelular (Hep-G2); alivio del deterioro cognitivo causado por diabetes (en ratas) (Zhang *et al.*, 2020); efecto hipoglucémico (en ratas) (El-Hawary *et al.*, 2021; Shaheen, 2019); potencial analgésico (en ratas) (Kanodia y Das, 2009) y usos cosméticos (Ziemlewska *et al.*, 2022). Además, se han detectado efectos

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. [p.55–68]

antimicrobianos de la hoja de fresa contra *Helicobacter pylori* (Cardoso et al., 2018), *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis* y *Micrococcus liti* (Al-Deen et al., 2013).

Conclusiones

Considerando el incremento mundial en el cultivo de fresa en las últimas décadas, las condiciones en zonas altas tropicales con climas templados, dosis elevadas de irradiación solar favorables para la producción de polifenoles antioxidantes (Kårlund et al., 2014), así como el perfil fitoactivo subutilizado de sus hojas, los residuos vegetativos del cultivo de fresa representan una fuente relevante y poco aprovechada de materia prima con alto potencial bioactivo. Siguiendo el ejemplo de múltiples experiencias que han revalorizado cultivos tropicales para la generación de alimentos funcionales, nutracéuticos, cosméticos, alimento animal, y biocombustibles (Cádiz-Gurrea et al., 2020).

Por lo tanto, y de especial importancia para países pequeños en desarrollo y con economías de base agrícola, es imperativo implementar mecanismos para mejorar el aprovechamiento de los residuos agroindustriales para darle un mayor valor agregado a los cultivos, con miras hacia una economía circular y en beneficio del ambiente y la salud humana.

Agradecimientos

Esta revisión fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y contó con el apoyo de la estudiante de Ingeniería en Biotecnología, María Fernanda Brenes Zárate.

Referencias

Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., y Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during

ripening. *Food Chemistry*, 1 (1), 132, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>

Afrin, S., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Reboledo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., ... Battino, M. (2016). Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4435–4449. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00857>

Al-Deen, A. T., Al-Naqeb, G., y Al-Maqdari, O. (2013). Investigation of antioxidant and antibacterial effects of *Dodonaea viscosa*, *Fragaria x ananassa* Duch and *Vernonia amygdalina* leaves. *Aden University Journal*, 17 (1), 1–14.

Barquero, J., Meneses, R., Barrantes, L., Ugalde, P., Villalobos, N., y Serrano, D. (2007). *Agrociencia de Fresa*, Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00070.pdf>

Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., y Lyons, T. J. (2014). Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review Strawberry As a Functional Food: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54(6), 790–806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>

Cádiz-Gurrea, M. de la L., Villegas-Aguilar, M. del C., Leyva-Jiménez, F. J., Pimentel-Moral, S., Fernández-Ochoa, A., Alahón, M. E., y Segura-Carretero, A. (2020). Revalorization of bioactive compounds from tropical fruit by-products and industrial applications by means of sustainable approaches. *Food Research International*, 138 (Part B), 109786. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109786>

Cardoso, O., Donato, M. M., Luxo, C., Almeida, N., Liberal, J., Figueirinha, A., y Batista, M. T. (2018). Anti-*Helicobacter pylori* potential of *Agrimonia eupatoria* L. and *Fragaria vesca*. *Journal of Functional Foods*, 44, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.027>

Carvalho, S. F. de, Correa, A. P. A., Ferreira, L. V., Vizzotto, M., y Antunes, L. E. C. (2021). Production, chemical components, and content of bioactive compounds of strawberry cultivars. *Revista Engenharia Na Agricultura*, 29, 275–285. <https://doi.org/10.13083/revehg.v29i1.10883>

Chaves, V. C., Calvete, E., y Reginatto, F. H. (2017). Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 225, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.013>

Cordenunsi, B. R., Nascimento, J. R. O., y Lajolo, F. M. (2003). Physico-chemical changes related to

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa
(*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. *Food Chemistry*, 83 (2), 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00059-1)

Cubero-Cardoso, J., Serrano, A., Trujillo-Reyes, A., Villa-Gómez, D. K., Borja, R., y Fermoso, F. G. (2020). Valorization Options of Strawberry Extrudate Agro-Waste: A Review. En Novo de Barros, A. y Gouveias, I. (Eds.), *Innovation in the Food Sector Through the Valorization of Food and Agro-Food By-Products*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93997>

Cvetković, D. I., Stanojević, L. P., Stanković, M. Z., Cakić, M. D., Svić, S. R., y Miljković, M. D. (2017). Antioxidant activity of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves. *Separation Science and Technology*, 52 (6), 1039–1051. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1281305>

da Silva, P. M., Lajolo, F. M., y Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107, 1629–1635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038>

Demchak, K. (2013). *The Mid-Atlantic Berry Guide for Commercial Growers 2013-2014*. The Pennsylvania State University Park, PA, USA. <http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/AGRS097.pdf>

El-Hawary, S. S., Mohammed, R., El-Din, M. E., Hassan, H. M., Ali, Z. Y., Rateb, M. E., ... El Nagar, El M. B., Othman, E. M., y Abdelmohsen, U. R. (2021). Comparative phytochemical analysis of five Egyptian strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) and antidiabetic potential of Festival and Red Merlin cultivars. *RSC Advances*, 11, 16755–16767. <https://doi.org/10.1039/d0ra10748d>

Fait, A., Hanjineva, K., Beleggia, R., Dai, N., Rogachev, I., Nikiforova, V. I., Ferlie, A., y Aharoni, A. (2008). Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiology*, 148, 730–750. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120691>

Ferlemi, A. V., y Lamari, F. N. (2016). Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants*, 5 (2), 2–10. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>

Fierascu, R. C., Temocico, G., Fierascu, I., Ortan, A., y Babeanu, N. E. (2020). *Fragaria* genus: Chemical composition and biological activities. *Molecules*, 25, 498. <https://doi.org/10.3390/molecules25030498>

Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Bompadre, S., Mezzetti, B., Quiles, J. L., Giampieri, F. y Battino, M. (2016). The Healthy Effects of Strawberry

Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (1), S46–S59. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1051919>

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., y Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function*, 10 (2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>

Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Cianciosi, D., Reboredo-Rodríguez, P., Valera-López, A., Quiles, J. L., Mezzetti, B., y Battino, M. (2017). The healthy effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences. Phytochemicals in Medicine and Food*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/nyas.13373>

Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Alvarez-Suarez, J. M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., y Battino, M. (2015). Strawberry as a health promoter: An evidence based review. *Food and Function*, 6, 1386–1398. <https://doi.org/10.1039/c5fo00147a>

Golovinskaja, O., y Wang, C. K. (2021). Review of functional and pharmacological activities of berries. *Molecules*, 26, 3904. <https://doi.org/10.3390/molecules26133904>

Husain, A. M., Mercado, J. A., Teixeira, J. A. da S., y Schaart, J. G. (2011). Review of Factors Affecting Organogenesis, Somatic Embryogenesis and Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Strawberry. *Genes, Genomes and Genomics* 5 (1), 1–11. <https://digital.csic.es/handle/10261/57836>

Imran, S. M., Saxena, D., Kazimi, R., y Pratap, S. (2022). Effects of various growing media, as well as jeevamrit, on the growth and production of strawberry: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 11 (4), 405–410. <https://www.thepharmajournal.com>

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA]. (2017). *Manual de buenas prácticas agrícolas y de producción para el cultivo de la fresa*. IICA. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/2932>

Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC]. (2015). *VI Censo Nacional Agropecuario: cultivos agrícolas, forestales y ornamentales*. San José, Costa Rica. <http://www.inec.go.cr/sites/default/files/documentos/agropecuario/publicaciones/reagropeccenagro2014-tit-007.pdf>

Kanodia, L. y Das, S. (2009). A comparative study of analgesic property of whole plant and fruit extracts of *Fragaria vesca* in experimental animal models.

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. [p.55–68]

Bangladesh Journal of Pharmacology, 4 (1), 35–38.
<https://doi.org/10.3329/bjpp.v4i1.1049>

Karlinska, E., Masny, A., Cieslak, M., Macierzynski, J., Pecio, Ł., Stochmal, A., y Kosmala, M. (2021). Ellagitannins in roots, leaves, and fruits of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) vary with developmental stage and cultivar. *Scientia Horticulturae*, 275, 109665. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109665>

Kärilund, A., Hanhineva, K., Lehtonen, M., McDougall, G. J., Stewart, D., y Karjalainen, R. O. (2017). Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), 2182–2190. <https://doi.org/10.1002/SFA.8027>

Kärilund, A., Salminen, J. P., Koskinen, P., Ahern, J. R., Karonen, M., Tilkka, K., y Karjalainen, R. O. (2014). Polyphenols in strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaves induced by plant activators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4592–4600. <https://doi.org/10.1021/jf405589f>

Kim, H., Bassil, N., y Njuguna, W. (2011). *Fragaria*. En Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Temperate Fruits*. Springer Berlin Heidelberg. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-16057-8>

Kobi, H. B., Martins, M. C., Silva, P. I., Souza, J. L., Carneiro, J. C. S., Heleno, E. F., Queiroz, M. L., y Costa, N. M. B. (2018). Organic and conventional strawberries: Nutritional quality, antioxidant characteristics and pesticide residues. *Fruits*, 73 (1), 39–47. <https://doi.org/10.17660/th2018/73.1.5>

Kumari, S., Sankhyani, S., y Kumar, A. (2020). Yield and quality characters of different strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivars growing under mid hill conditions of Himachal Pradesh. *The Pharma Innovation Journal*, 9 (6), 425–428. <https://www.thepharmajournal.com>

Lema-Rumińska, J., Kulus, D., Tymoszyk, A., Miler, N., Wozny, A., y Wenda-Piesik, A. (2021). Physiological, biochemical, and biometrical response of cultivated strawberry and wild strawberry in greenhouse gutter cultivation in the autumn–winter season in Poland—preliminary study. *Agronomy*, 11 (8), 1633. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081633>

Liston, A., Cronn, R., y Ashman, T. L. (2014). *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*, 101(10), 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>

Liu, Z., Ma, H., Jung, S., Main, D., y Guo, L. (2020). Developmental Mechanisms of Fleshy Fruit Diversity in Rosaceae. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 547–573. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-111119-021700>

Marta, A. E., Camadro, E. J., Díaz-Ricci, J. C., y Castagnaro, A. P. (2004). Breeding barriers between the cultivated strawberry, *Fragaria × ananassa*, and related wild germplasm. *Euphytica*, 136(2), 139–150. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000030665.95757.76>

Massetani, F., Gangatharan, R., y Neri, D. (2011). Plant Architecture of Strawberry in Relation to Abiotic Stress, Nutrient Application and Type of Propagation System. En Husaini, A.M., y Mercado, J.A. (Eds.), *Genes, Genomes and Genomics*, 12–23. Global Science Books, UK.

Michalska, A., Carlen, C., Heritier, J., y Andlauer, W. (2017). Profiles of bioactive compounds in fruits and leaves of strawberry cultivars. *Journal of Berry Research*, 7 (2), 71–84. <https://doi.org/10.3233/JBR-160146>

Miller, K., Feucht, W., y Schmid, M. (2019). Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. *Nutrients*, 11 (7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11071510>

Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica [MAG]. (2014). *Fragaria Spp. Rosaceae*. MAG. http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/téc_fresa.pdf

Nunes, G., Teixeira, F., Schwarz, K., Camargo, C. K., De Resende, J. T. V., Dos Santos, E. F., Franco, B. C., y Novello, D. (2021). Influence of genetic variability on the quality of strawberry cultivars: Sensorial, physical-chemical and nutritional characterization. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 43, e46862. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.46862>

Nunes, M. C. N., Brecht, J. K., Morais, A. M. M. B., y Sargent, S. A. (2005). Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (cv. Oso Grande) during storage at 1°C. *Journal of Food Science*, 70 (1), S79–S84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09069.x>

Oguz, H. I., Zorlugenc, F. K., Zorlugenc, B., y Kafkas, N. E. (2017). A study on the variance of phytochemical properties in the fruit of some strawberry cultivars (*Fragaria ananassa* L.) grown under environmental conditions in Adana region. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(6), 3963–3969. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173286393>

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa
(*Fragaria x ananassa*) en Costa Rica

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2021). FAOStat. FAO. <https://www.fao.org>

Ornelas-Paz, J. D. J., Yahia, E. M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martínez, J. D., Escalante-Minakata, M. D. P., Ibarra-Junqueira, V., Acosta-Munoz, C., Guerrero-Prieto, V., y Ochoa-Reyes, E. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*, 138 (1), 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.006>

Palei, S., Das, A. K., y Rout, G. R. (2015). *In vitro* studies of strawberry – an important fruit crop: a review. *Journal of Plant Science and Research*, 31 (2), 115–131. <https://www.proquest.com/scholarly-journals/vitro-studies-strawberry-important-fruit-crop/docview/178781691/se-2?accountid=27651>

Paparozi, E. T., Meyer, G. E., Schlegel, V., Blankenship, E. E., Adams, S. A., Conley, M. E., Loseke, B. y Read, P. E. (2018). Strawberry cultivars vary in productivity, sugars and phytonutrient content when grown in a greenhouse during the winter. *Scientia Horticulturae*, 227, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2017.07.048>

Pinheiro, D. F., de Resende, J. T. V., Constantino, L. V., Hata, F. T., Hata, N. N. Y., & Lustosa, S. B. C. (2021). Physical, biochemical, and sensory properties of strawberries grown in high-altitude tropical climate. *Ciência e Agrotecnologia*, 45, e008221. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145008221>

Prasad, R., Lisiecka, J., y Raj, K. (2022). Strawberry – More than a Popular Summer Fruit: A Mini-Review. *Advances in Nutrition and Food Science*, 2022 (2), 1–5. <https://doi.org/10.37722/ANAFS.2022201>

Programa de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria-Fresa [PITTA-Fresa]. (2022). (PITTA-Fresa). Comunicación Personal. Costa Rica.

Programa Integral de Mercado Agropecuario [PIMA]. (2016). *Análisis del consumo de frutas, hortalizas, pescado y mariscos en los hogares costarricenses*. PIMA. Costa Rica. <http://www.pima.go.cr>

Rodríguez-Gutiérrez, G., Cubero Cardoso, J., Rubio-Senerit, F., Serrano, A., Borja, R., Fernández-Bolaños, J., y Fermojo, F. G. (2019). Thermally-treated strawberry extrudate: A rich source of antioxidant phenols and sugars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.017>

Roshan, R., Ahmed, S., y Mohtasheem ul Hassan, M. (2019). *Fragaria rubicula* (Rosaceae): A review of medicinal uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8 (4), 3390–3393. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue4/PartBC/8-4-513-799.pdf>

Ruan, J., Lee, Y. H., Hong, S. J., y Yepung, Y. R. (2013). Sugar and organic acid contents of day-neutral and ever-bearing strawberry cultivars in high-elevation for summer and autumn fruit production in Korea. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 54 (3), 214–222. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0186-8>

Ruiz Anchondo, T., Adriano Martínez, J., Carrillo Castillo, T., Parra Ojeda, R. A., Ojeda Barrios, D. L., y Hernández Rodríguez, A. (2018). Establecimiento *in vitro* de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9 (4), 799–812. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i4.1397>

Saroj, N. L., Singh, S., y Yadav, S. (2021). Strawberry: A Wonder Crop suitable for Hydroponics. *Journal of Horticulture*, 08 (2), 1–3. <https://doi.org/10.35248/2376-0354.21.8.279>

Sato, T., Ikeya, Y., Adachi, S. ichi, Yagasaki, K., Nihei, K. ichi, y Itoh, N. (2019). Extraction of strawberry leaves with supercritical carbon dioxide and entrainers; Antioxidant capacity, total phenolic content, and inhibitory effect on uric acid production of the extract. *Food and Bioprocess Technology*, 117, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.07.003>

Serrano-Moral, A. (2015). *Tratamiento de residuos y subproductos agroindustriales mediante co-digestión anaerobia*. [Tesis de maestría]. Universidad de Córdoba, Colombia. <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/12558>

Shaheen, E. M. S. (2019). Protective effect of *Fragaria* induced diabetes in rats ananassa against streptozotocin-induced diabetes in rats. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*, 15 (1), 69–75. <https://doi.org/10.5455/egysebz.20190415100613>

Simpson, D. (2018). The Economic Importance of Strawberry Crops. En Hytönen, T., Graham, J., y Harrison R. (Eds.), *The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives*, 1–7. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76020-9_1

Singh, A., Singh, B. K., Deka, B. C., Sanwal, S. K., Patel, R. K., y Verma, M. R. (2011). The genetic variability, inheritance and inter-relationships of

Ministerio de Ambiente y Energía Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO)

Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales
Volumen 9 (2). Julio – Diciembre. [p.55-68]

ascorbic acid, β -carotene, phenol and anthocyanin content in strawberry (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 129 (1), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.scianta.2011.03.011>

Skupien, K., Oszmianski, J., Kostrzewa-Nowak, D., y Tarasiuk, J. (2006). *In vitro* antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Letters*, 236 (2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.05.018>

Staudt, G. (2009). Strawberry biogeography, genetics and systematics. *Acta Horticulturae*, 842, 71–84. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.842.1>

Staudt, G. (1999). *Systematics and Geographic Distribution of the American Strawberry Species: Taxonomic Studies in the Genus Fragaria (Rosaceae: Potentillaceae)* (81). University of California Press.

Toop, T. A., Ward, S., Oldfield, T., Hull, M., Kirby, M. E., y Theodorou, M. K. (2017). AgroCycle – Developing a circular economy in agriculture. *Energy Procedia*, 123, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.269>

Tumbas, S. V., Gironés-Vilaplana, A., Djilas, S., Mena, P., Cetković, G., Moreno, D. A., Canadanović-Brunet, J., Vulić, J., Stajčić, S., y Vincić, M. (2015). Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Advances*, 5(7), 5397–5405. <https://doi.org/10.1039/c4ra14296a>

Urün, I., Attar, S. H., Sönmez, D. A., Gündesli, M. A., Erçişli, S., Kafkas, N. E., Bandić, L. M., y Đurđević, B. (2021). Comparison of polyphenol, sugar, organic acid, volatile compounds, and antioxidant capacity of commercially grown strawberry cultivars in Turkey. *Plants*, 10, 1654. <https://doi.org/10.3390/plants10081654>

Van de Velde, F., Tarola, A. M., Güemes, D., y Pirovani, M. E. (2013). Bioactive compounds and antioxidant capacity of camarosa and selva strawberries (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.). *Foods*, 2 (2), 120–131. <https://doi.org/10.3390/foods2020120>

Vargas, C. Y. A. y Pérez, P. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14 (1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>

Vázquez-González, M., Fernández-Prior, Á., Bermúdez, O. A., Rodríguez-Juan, E. M., Pérez-Rubio, A. G., Fernández-Bolaños, J., y Rodríguez-Gutiérrez, G. (2020). Utilization of strawberry and raspberry waste for the extraction of bioactive compounds by deep eutectic solvents. *LWT - Food Science and Technology*, 130, 109645. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109645>

Villamil-Galindo, E., Van, de V. F. y Piagentini, A. M. (2020). Extracts from strawberry by-products rich in phenolic compounds reduce the activity of apple polyphenol oxidase. *LWT - Food Science and Technology*, 133, 110097. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110097>

Villamil-Galindo, E., Van, de V. F. y Piagentini, A. M. (2021). Strawberry agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds: effect of cultivar on the phenolic profile and the antioxidant capacity. *Bioresources and Bioprocessing*, 8 (61). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00416-z>

Warner, R., Wu, B., Sen, MacPherson, S., y Lefsrud, M. (2021). A Review of Strawberry Photobiology and Fruit Flavonoids in Controlled Environments. *Frontiers in Plant Science*, 12, 611893. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.611893>

Zhang, L., Ma, Q., y Zhou, Y. (2020). Strawberry leaf extract treatment alleviates cognitive impairment by activating Nrf2/HO-1 signaling in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 201. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00201>

Zhu, Q., Nakagawa, T., Kishikawa, A., Ohnuki, K., y Shimizu, K. (2015). *In vitro* bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (*Fragaria* $\times$ *ananassa* var. Amaou). *Journal of Functional Foods*, 13, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.026>

Ziemlewska, A., Nizioł-Lukaszewska, Z., Zagórska-Dziok, M., Bujak, T., Wojciak, M., y Sowa, I. (2022). Evaluation of cosmetic and dermatological properties of kombucha-fermented berry leaf extracts considered to be by-products. *Molecules*, 27 (7), 2345. <https://doi.org/10.3390/molecules27072345>

Anexo 4. Artículo 2 (publicado)



Article

Strawberry *Fragaria x ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts

Karla Salas-Arias ^{1,2}, Andrea Irias-Mata ³, Andrés Sánchez-Kopper ⁴, Ricardo Hernández-Moncada ², Bridget Salas-Morgan ², Fabián Villalta-Romero ^{2,*†} and Laura A. Calvo-Castro ^{2,†}

- ¹ Doctorado en Ciencias Naturales Para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Cartago P.O. Box 159-7050, Costa Rica
 - ² Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago P.O. Box 159-7050, Costa Rica
 - ³ Centro de Investigación en Granos y Semillas, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José P.O. Box 2060, Costa Rica
 - ⁴ Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos, Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago P.O. Box 159-7050, Costa Rica
- * Correspondence: fvillalta@itcr.ac.cr; Tel.: +506-2550-9411
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Salas-Arias, K.; Irias-Mata, A.; Sánchez-Kopper, A.; Hernández-Moncada, R.; Salas-Morgan, B.; Villalta-Romero, F.; Calvo-Castro, L.A. Strawberry *Fragaria x ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts. *Molecules* 2023, 28, 1865. <https://doi.org/10.3390/molecules28041865>

Academic Editor: Stefano Dall'Acqua

Received: 24 January 2023

Revised: 3 February 2023

Accepted: 10 February 2023

Published: 16 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Berry fruits are an important dietary source of health-promoting antioxidant polyphenols. Interestingly, berry leaves of diverse species, including strawberries, have shown higher bioactive phytochemical content in the leaves than in the fruit. Moreover, the vegetative part of the plants is usually discarded, representing a presumably large source of underutilized bioactive biomass. In this investigation, the polyphenol profiles of tropical highland strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaves and fruits were compared by high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (UHPLC-DAD) and mass spectrometry (HPLC-MS). The total polyphenol strawberry leaf extracts exhibited a 122-fold-higher total polyphenol content and 13-fold higher antioxidant activity (ORAC) than strawberry fruits, and they showed evidence of possible photoprotective effects against UV damage in human melanoma cells (SK-MEL-28) and in murine embryo fibroblasts (NIH/3T3), together with promising anti-proliferative activities against the same melanoma cells. Seven polyphenols were confirmed by HPLC-DAD in the leaf extracts, with differences depending on fraction solubility. Moreover, three substituted quercetin derivatives, three substituted kaempferol derivatives, two anthocyanins, and catechin were confirmed in the soluble fraction by HPLC-MS. Given their higher total polyphenol content and bioactive activities, underutilized strawberry Festival leaves are a potential source of apparently abundant biomass with prospective bioactive applications.

Keywords: *Fragaria x ananassa* cv. Festival; leaves; polyphenols; strawberry

1. Introduction

Commercial strawberries (*Fragaria x ananassa*) are one of the world's most available and consumed fruits. By 2020, the global production of strawberries reached over 12 million tons in 79 countries [1], with an average annual consumption (as of 2018) of 4.5–5 kg per capita in the United States and Europe, respectively [2]. As an extensive crop, it also generates presumably large amounts of residues. Non-marketable fruit (small-sized and misshapen berries, with pest and disease damage or albinism) may reach up to 17% of total yields [3], and the vegetative parts of the plant (leaves, stems, and roots) are mostly discarded [4]. Moreover, around 21% of the strawberry fruit production is transformed for manufacturing processed products, yielding additional industrial organic wastes (mostly pulp and press residues) [5], all of which still contain relevant amounts of bioactive compounds [5–8].

All strawberry plant components (*Fragaria* sp.) have been shown to provide several benefits for human health (reviewed extensively in [9–16]); however, research has focused mainly on the fruit, while the biochemical profile and the biological activities of the vegetative parts have been less studied [17–20]. Plenty of these healthy effects have been associated with the polyphenol content in strawberry fruit; nevertheless, recent studies have shown more diversity and higher concentrations of bioactive polyphenols in strawberry leaves (Table 1) [17,18,20–22].

Berry leaves have been used in traditional remedies claiming to treat several diseases, including colds, gastroenteritis, diabetes, and circulatory ailments; however, berry leaf medicinal products have only recently been formally accepted in Europe, the United States, and Canada, and it mostly refers to the use of berry leaves in herbal teas [23,24]. To the best of our knowledge, no human studies with strawberry leaf interventions have been reported to date; nevertheless, the European Medicines Agency [25] communicated in 2019 that, based on long-term traditional practice, strawberry leaves can be used to induce urination and to relieve symptoms of mild diarrhea.

In vitro experiments with strawberry leaf extracts have reported several biological activities, including cytotoxic effects against leukemia HL60 human cells [26]; antioxidant activity [27,28]; antibacterial activity [29]; anti-allergic and anti-obesity effects [22]; and melanogenesis inhibition [22]. The animal testing of strawberry leaf extracts has shown hypoglycemic effects in diabetic mice [30] and rats [19]; antioxidant, anti-inflammatory, and cognitive-improvement effects in diabetic rats [31]; nephrotoxicity protection in displastin-dosed rats [32]; and improved responses in renal function, insulin, and free thyroid hormones in potassium bromate-treated rats [33]. Duru et al. [34] also showed no adverse effects on the egg quality and health status of laying hens after strawberry leaf powder intake for 10 weeks.

Hence, strawberry leaves are a broadly available source of valuable and underutilized bioactive materials that can be harvested yearly after fruiting [24]. In this study, we explored the phenolic profile and bioactivity of *F. x ananassa* cv. Festival fruit and leaf extracts. Strawberry Festival is a short-day vigorous cultivar, with an apparent lesser susceptibility to botrytis fruit rot (caused by *Botrytis cinerea*) and to powdery mildew (caused by *Sphaerotheca macularis*) compared to that of other varieties [35]. Strawberry Festival has also shown a higher total polyphenol content in leaves than other strawberry cultivars (Table 1). To the best of our knowledge, this is the first report describing the leaf polyphenols of strawberries cultivated in the Costa Rican tropical highlands.

Table 1. Total polyphenol content in the fruit and leaves of some strawberry (*Fragaria x ananassa*) varieties.

Cultivar	Total Polyphenols (mg GAE g ^{−1} DW) ^a		Ref.
	Fruit	Leaf	
Allstar	19.71 ± 0.20	55.2 ± 3.6	[28]
Amaou	15.6 ± 3.7	117.1 ± 2.7	[22]
Camino Real	1.8 ± 0.11 (FW)	6.14 ^b	[4,36]
Diana	–	14.76	[18]
Elsanta	24.11	3.73 ^c	[37]
Festival	20 ± 0.1	62.37 ± 0.1	[19]
Mount Everest	–	293.63 ± 1.95	[27]
Polka	2.57 ± 0.02 (FW)	81.15 ± 0.64 ^c	[21,38]
Red Merlin	33.33 ± 0.1	72.1 ± 0.1	[19]
San Andreas	–	8.93 ^b	[4]
Senga Sengana	15.2 (FW)	326.57 ± 0.82	[27,39]
Suzana	35.24 ± 0.3	72.63 ± 0.1	[19]
Tamar	21.1 ± 0.5	42.63 ± 0.2	[19]
Tochiotome	–	122.3	[40]
Winter Dawn	31.42 ± 0.1	66.58 ± 0.2	[19]

^a DW, dry weight; FW, fresh weight; GAE, gallic acid equivalents. ^b Industrial strawberry by-products, including sepals, peduncles, and the non-marketable portion of the fruit. ^c Total sum of several polyphenols quantified by analytical methods as mg g^{−1} DW.

2. Results

2.1. Preliminary Phytochemical Analysis of Total Polyphenol Fruit and Leaf Extracts

To analyze the phytochemical components of strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) leaves, three hydro-alcoholic extraction methods were preliminary tested, i.e., maceration at room temperature with 70% or 95% ethanol and infusion at 60 °C with 70% ethanol, yielding 3.85 ± 0.08 g (*n* = 3), 1.7 g, and 3.23 g recovery of the total dried leaf extract (from a 10 g sample), respectively. The 70% ethanol maceration had the highest total polyphenol recovery relative to the 95% ethanol maceration and the 70% ethanol infusion (104.1 and 49.18 mg GAE g⁻¹ DW, respectively). On the other hand, the 95% ethanol maceration had slightly higher total flavonoid recovery (12.99 mg QE g⁻¹ DW) relative to the 10.25 mg GAE g⁻¹ DW obtained with both the 70% ethanol maceration and the 70% ethanol infusion. Nonetheless, the 70% ethanol maceration showed the highest antioxidant activity, requiring less of the extract (DPPH IC₅₀ 9.45 mg g⁻¹ DW) to achieve 50% DPPH inhibition than the other extractions (DPPH IC₅₀ required 14.32 mg g⁻¹ DW of 95% ethanol leaf extract and 11.51 mg g⁻¹ DW of 70% ethanol leaf infusion). Moreover, alkaloids were absent only in the 70% ethanol maceration leaf extract (data not shown). Hence, the 70% ethanol maceration was selected for extracting total polyphenols from strawberry leaves and for comparison against fruit.

The total polyphenol content in the total polyphenol strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) extracts (70% ethanol) was 122 times higher in leaves than in fruits, while the antioxidant activity was 13-fold higher in the leaves (Table 2). Only very small amounts of chlorophylls and carotenoids were recovered from both parts of the plant. Saponins were not detected in the fruit, while steroids and terpenoids were not detected in the leaf. Alkaloids were not detected in either of the plant extracts.

Table 2. General physicochemical composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) fruit or leaves in total polyphenol extracts (*n* = 3).

Parameter	Fruit Extract	Leaf Extract
Protein (mg g ⁻¹ DW)	28.63 ± 2.09	80.63 ± 1.13
Soluble solids (° Brix)	1%	0.40%
Saponins (foam test)	Negative	Positive
Steroids and terpenoids (Liebermann–Buchard test)	Positive	Negative (no color)
Alkaloids (Dragendorf test)	Negative (no color)	Negative (no color)
Flavonoids (Shinoda test)	Positive (light red)	Positive (red color)
Total polyphenols (mg GAE g ⁻¹ DW)	0.89 ± 0.05	108.83 ± 4.65
Total flavonoids (mg QE g ⁻¹ DW)	0.32 ± 0.01	10.25 ± 0.50
Total chlorophyll (mg g ⁻¹ DM)	0.2832 ± 0.0224	1.9470 ± 0.6399
Total carotenoids (mg g ⁻¹ DW)	0.0013 ± 0.0020	0.0074 ± 0.0933
ORAC (μmol TE g ⁻¹ DW)	221 ± 70	2918 ± 281

GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents; TE, trolox equivalents. ORAC was determined by the QUIMED Laboratory at Universidad Nacional de Costa Rica.

2.2. Chromatographic Analysis

Seven polyphenols were quantified by UHPLC-DAD in total, soluble, and insoluble polyphenol extracts from strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) fruit and leaves (Figure 1, Table 3). The highest polyphenol concentrations were found in the insoluble leaf extract, with gallic acid being the most abundant polyphenol, followed by ellagic acid and quercetin. On the contrary, gallic acid and quercetin were not detected in the soluble leaf fraction. When detected, all compounds were present in higher concentrations in the soluble and insoluble leaf extracts relative to the fruit. All seven polyphenols were present in the total polyphenol leaf extract, but in much lower concentrations than in the soluble and insoluble leaf fractions.

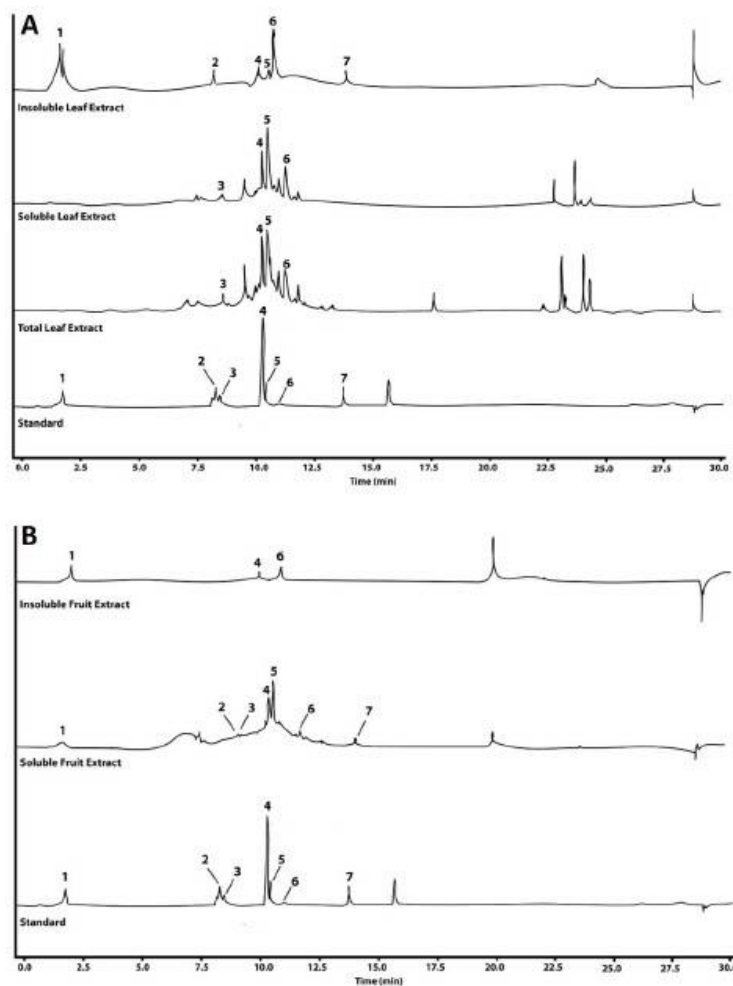


Figure 1. Representative UHPLC-DAD chromatograms of the polyphenols identified in the total, soluble, and insoluble polyphenol extracts of the strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf (A) and fruit (B) compared to authentic standards. The identity of the polyphenols is as follows: 1, gallic acid; 2, caffeic acid; 3, chlorogenic acid; 4, *p*-coumaric acid; 5, rutin; 6, ellagic acid; 7, quercetin.

Untargeted high-resolution mass spectrometry was used to identify the polyphenols present in the soluble strawberry leaf extracts. A tentative identification was assigned to the more intense features present in the samples by comparison with the structure database searches and de novo fragmentation patterns and confirmed by manual interpretation. Nine compounds were identified, including three substituted quercetin derivatives, three substituted kaempferol derivatives, two anthocyanins (delphinidin and pelargonidin), and catechin (Figure 2, Table 4).

Table 3. Specific polyphenols (mean $\pm$ standard deviation; $n = 4$) detected and quantified by UHPLC-DAD in the total, soluble, and insoluble polyphenol extracts of the strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) fruit and leaves.

Peak	Compound	Retention Time (min)	UV/Vis Wave-length (nm)	Polyphenol Concentration in [$\mu\text{g mg}^{-1}$ DW] in the Extract				
				Insoluble Extract		Soluble Extract		Total Extract
				Fruit	Leaf	Fruit	Leaf	Leaf
1	Gallic acid	2.06	201/220/270	2.10 $\pm$ 1.40	57.53 $\pm$ 36.84	0.04 $\pm$ 0.01	n.d.	0.0010 $\pm$ 0.0001
2	Caffeic acid	8.51	216/240/322	n.d.	3.62 $\pm$ 4.97	0.14 $\pm$ 0.12	n.d.	0.0028 $\pm$ 0.0002
3	Chlorogenic acid	8.69	215/320	n.d.	n.d.	0.17 $\pm$ 0.18	0.66 $\pm$ 0.31	0.20 $\pm$ 0.02
4	<i>p</i> -coumaric acid	10.51	209/310	1.50 $\pm$ 0.56	3.70 $\pm$ 2.68	0.21 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.09	1.14 $\pm$ 0.23
5	Rutin	10.63	201/256/355	n.d.	7.14 $\pm$ 3.40	0.58 $\pm$ 0.07	4.67 $\pm$ 0.70	5.59 $\pm$ 2.69
6	Ellagic acid	11.15	196/254/366	0.11 $\pm$ 0.21	21.90 $\pm$ 39.72	0.26 $\pm$ 0.09	1.35 $\pm$ 0.08	0.88 $\pm$ 0.57
7	Quercetin	13.91	201/255/370	n.d.	19.44 $\pm$ 3.98	0.05 $\pm$ 0.09	n.d.	0.098 $\pm$ 0.003

n.d. = not detected.

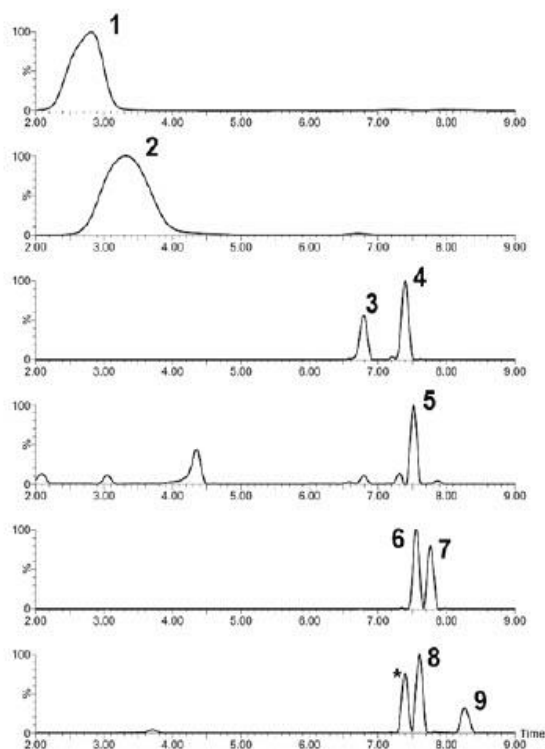


Figure 2. Combined extracted ion chromatograms of the most intense signals present in the high-resolution mass spectrometry measurements of the strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) soluble leaf extract. Peak identification is detailed in Table 4. 1, catechin; 2, pelargonidin; 3, 4, and 8, quercetin glucuronides; 5, delphinidin; 6, 7, and 9, kaempferol derivatives. The asterisk corresponds to the aglycone in-source fragment of compound 4.

Table 4. Tentative identification of the most intense features present in the high-resolution mass spectrometry measurements of the strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) soluble leaf extract.

Peak	Compound Subclass	Tentative Identification	Formula	m/z	Adducts	Rt (min)	Assigned Fragments (m/z)
1	Flavan 3-ol derivatives	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0887	[M+H] ⁺	2.91	273, 165, 147, 139, 123
2	Pelargonidin 3-glucoside	Pelargonidin 3-glucoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁺	433.1130	M ⁺	3.32	433, 271
3	Flavonoid 3-o-glucuronides	Quercetin 3-glucosyl-(1->2)-glucuronide	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈	641.1355	M+H, M+Na	6.8	641, 465, 303
4	Flavonoid 3-o-glucuronides	Quercetin 3-o-xylcosyl-glucuronide	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₇	611.1324	[M+H] ⁺	7.4	611, 479, 303
5	Anthocyanin glycoside	Delphinidin 3-galactoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ ⁺	465.1051	M ⁺	7.51	465, 303
6	Flavonoid o-rutinoside	Kaempferol 7-o-rutinoside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595.1318	M+H	7.55	595, 463, 287, 153, 113
7	Flavone o-glucoside	Kaempferol 3'-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.0876	M+H, M+Na	7.76	436, 287, 165, 153
8	Flavonoid 3-o-glucuronides	Quercetin 3-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	479.0827	M+H, M+Na	7.61	303, 301, 179, 151
9	Flavonoid 3-o-p-coumaroyl glycoside	Kaempferol 3-(6''-p-coumaroyl)galactoside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595.1461	M+H	8.24	287, 147, 119

2.3. Cytotoxic Activity

The cytotoxic effect (neutral red assay) of the total polyphenol strawberry leaf extract was evaluated in SK-MEL-28 human melanoma cells and in NIH/3T3 murine fibroblasts. Extract concentrations above 0.1 mg extract mL⁻¹ significantly reduced the cell viability relative to the untreated controls in both cell lines (Figure 3). The extract's half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were very similar in both cell lines.

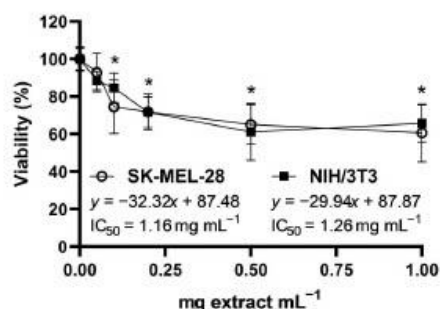


Figure 3. Percentage of cell viability (neutral red assay, mean $\pm$ SD, $n = 9$) of SK-MEL-28 (human melanoma) and NIH/3T3 (murine embryo fibroblasts) cells after 24 h of treatment with total polyphenol strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1 mg extract mL⁻¹). Concentrations (in both cell lines) statistically different ($p < 0.05$) from the untreated control are marked by asterisks (one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test, GraphPad Prism, v. 9.4.1). IC₅₀, half-maximal inhibitory concentration.

2.4. UVA + UVB Photoprotection

SK-MEL-28 melanoma cells and NIH/3T3 murine fibroblasts were treated with the total polyphenol strawberry leaf extract before, after, or during UV irradiation (UVA + UVB 25 mJ cm⁻²). The UV dose reduced the cell viability to $67.40 \pm 2.53\%$ and $59.49 \pm 3.75\%$ in SK-MEL-28 and NIH/3T3 cells, respectively (Figure 4). The total polyphenol strawberry leaf extract (0.5 mg extract mL⁻¹) significantly increased the cell viability of UV-irradiated SK-MEL-28 cells treated with the extract after or during UV irradiation. In the NIH/3T3 fibroblasts, pre-treatment with the total polyphenol strawberry leaf extract (0.1 mg extract mL⁻¹) significantly decreased the cell viability of the UV-irradiated cells.

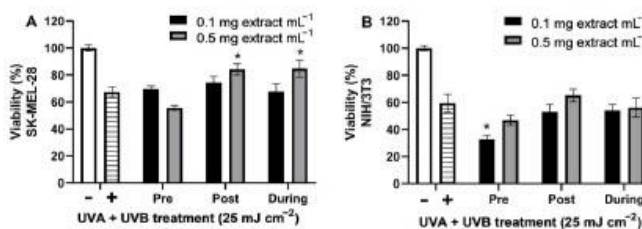


Figure 4. Percentage of cell viability (MTT assay; mean $\pm$ SEM, $n = 6$) of SK-MEL-28 (human melanoma, A) and NIH/3T3 (murine embryo fibroblasts, B) cells after treatment with total polyphenol strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (0.1 and 0.5 mg extract mL⁻¹) before (24 h), after (24 h), or during (15 min) UV irradiation (UVA + UVB 25 mJ cm⁻²). Controls of untreated cells (white bars) and UV-only-treated cells (striped bars) are also shown. Extract treatments that significantly ($p < 0.05$) affected cell viability relative to the UV controls are marked with an asterisk (one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test, GraphPad Prism, v. 9.4.1).

2.5. Scratch Wound Healing Assay

Wound closure was evaluated on scraped SK-MEL-28 and NIH/3T3 monolayers treated with the total polyphenol strawberry leaf extract for 72 h. None of the extract treatments significantly improved the cell migration or proliferation in either of the cell lines. In fact, the murine fibroblast monolayers fully detached after 48 h with the higher concentrations and did not recover after the leaf extract was removed (Figure 5). In the SK-MEL-28 melanoma cells, the leaf extract delayed the wound closure, but the lesion almost fully recovered after 72 h in extract-free media, except in the 0.5 mg extract mL⁻¹ treatment.

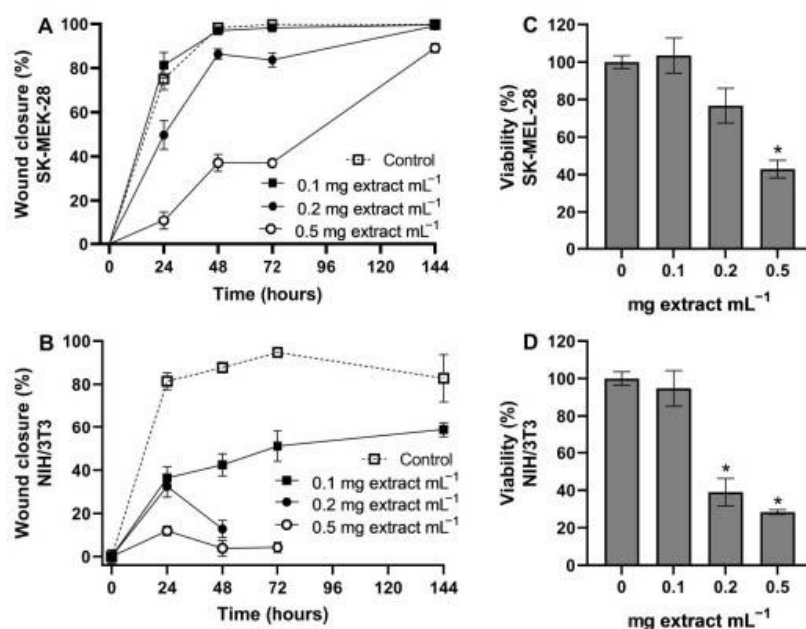


Figure 5. Scratch Wound Healing assay on scraped SK-MEL-28 (human melanoma (A,C)) and NIH/3T3 (murine embryo fibroblasts (B,D)) monolayers treated with total polyphenol strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (0.1, 0.2, 0.5 mg extract mL⁻¹) for 72 h. Afterwards, the extract was removed, and the cells were kept in fresh media for another 72 h to allow for recovery. (A,B). Percentage (mean $\pm$ SEM, $n = 6$) of cell confluence in the lesion over time, calculated as the area covered with cells using the software Image J. (C,D). Percentage (mean $\pm$ SEM; $n = 9$ for SK-MEL-28, $n = 6$ for NIH/3T3) of cell viability (MTT assay) 72 h after replacing the extract with fresh media. Statistical differences ($p < 0.05$) in cell viability between the treatments and the untreated control are marked with an asterisk (one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test, GraphPad Prism, v. 9.4.1).

3. Materials and Methods

3.1. Extract Preparation

Total polyphenol extraction. Ripe strawberry fruits and adult strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) were purchased from Fresas de Altura S.A. in Llano Grande, Cartago, Costa Rica (permit R-CM-ITCR-001-2022-OT-CONAGEBIO). The samples came from a greenhouse where they were treated with ozone against plagues. The plant material was healthy, with no observable morphological or pathological alterations. The leaves were green in color and approximately 8 $\times$ 5 cm in size. Extraction was conducted as reported before [41]. Freeze-dried whole fruits or leaves were ground in a food processor (fruits) or

in a mill (leaves; 1 mm, MF-10 basic IKA, WERKE) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until extraction. The dried material was extracted by three consecutive water-ethanol macerations (1:10, plant material to solvent). The solvent was eliminated in a vacuum evaporator ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$, R-300, BUCHI), and the remaining concentrate was freeze-dried and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Soluble and insoluble polyphenol extraction. Following the procedure by Lux et al. [42], soluble free and conjugated polyphenols were extracted from 100 mg of the same freeze-dried plant material, mixed with 3 mL of aqueous methanol (80%, v/v) for 1 min in an ultrasonicator (Sonoplus, Bandelin, Germany), and centrifuged at $1718\times g$ for 10 min. The supernatant was transferred to a fresh tube, and the extraction was repeated with 2 mL of aqueous methanol (80%, v/v) two more times. The combined supernatants were dried in a centrifugal vacuum-evaporator (Vacufuge, Eppendorf, Hamburg, Germany). For recovering insoluble bound polyphenols, the solid remainder from the soluble extraction was resuspended in 2 mL aqueous NaOH solution (2 mol L^{-1}) and stirred for 4 h at $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The solution was acidified (6 mol L^{-1} HCl) to pH 2, 2 mL of purified water was added, and three consecutive extractions were performed with ethyl acetate, following the same conditions mentioned above.

3.2. Phytochemical Analysis

The total polyphenol fruit and leaf extracts were preliminary evaluated for the detection of flavonoids (Shinoda test), steroids and terpenoids (Liebermann–Buchard test), alkaloids (Dragendorff test), and saponins (foam test) [43,44]. Soluble solids were determined in a refractometer (ATAGO) as the percentage °Brix.

The total polyphenol content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method, as described by Rojas-Garbanzo et al. [45]. Fruit and leaf extracts were incubated with Folin–Ciocalteu reagent and sodium carbonate solution (75 g L^{-1}) at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min, and the absorbance was measured at $\lambda = 620\text{ nm}$ (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). TPC was calculated against an external calibration curve of gallic acid ($10\text{--}80\text{ mg GAE L}^{-1}$, $r^2 = 0.9909$), and it is expressed as μg of gallic acid (>99% purity, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) equivalents (GAE) per gram of extract. The results are shown as the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

The total flavonoid content (TFC) was analyzed by the aluminum chloride method described by Fernandes et al. [46]. Fruit and leaf extracts ($10\text{ mg extract mL}^{-1}$ in methanol) with 2% aluminum chloride solution (in methanol) were incubated for 10 min at room temperature. The absorbance was measured at $\lambda = 450\text{ nm}$ (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), and TFC was calculated against an external calibration curve of quercetin ($0\text{--}160\text{ mg QE L}^{-1}$, $r^2 = 0.9981$) and is expressed as mg of quercetin (>99% purity, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) equivalents (QE) per gram of extract. The results are shown as the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

To determine the chlorophyll and carotenoid content, the UV-VIS spectrum was recorded at $\lambda = 200\text{--}750\text{ nm}$ (Shimadzu UV1800), with dimethylsulfoxide (DMSO) as a blank probe. The pigment content based on the absorbance was calculated as previously described [47], as follows:

$$\begin{aligned}\text{Chlorophyll A } (\mu\text{g/mL}) &= 12.47 A_{665.1} - 3.62 A_{649.1} \\ \text{Chlorophyll B } (\mu\text{g/mL}) &= 25.06 A_{649.1} - 16.5 A_{665.1} \\ \text{Total carotenoids } (\mu\text{g/mL}) &= \frac{1000 A_{480} - 1.29 C_A - 53.78 C_B}{220}\end{aligned}$$

The protein content was analyzed using the Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (BIO-RAD), following the manufacturer's protocol. The total protein concentration was calculated by comparing it against an external bovine serum albumin (BSA) standard curve ($0\text{--}2\text{ mg mL}^{-1}$, $r^2 = 0.973$).

The antioxidant activity was determined by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay, as described by Wang et al. [48]. Leaf samples ($10\text{ mg extract mL}^{-1}$ in 70% ethanol) diluted in methanol were incubated with DPPH (0.5 mM in methanol)

at 37 °C for 30 min in the dark. Absorbance was measured at $\lambda = 544$ nm (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH), and the radical scavenging activity is shown as the DPPH percentage inhibition = $[Ac - As - Ab]/(Ac \times 100)$, where Ac is the absorbance of the negative control (DDPH without sample), As is the absorbance of the sample, and Ab is the absorbance of the sample without DPPH. The IC_{50} (the concentration of the sample required to inhibit the DPPH response by 50% with respect to the untreated control) was calculated from the linear equation of each curve (Graph-Pad Prism, v. 9.1.1; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) was determined in the fruit and leaf total polyphenol extracts by the QUIMED Laboratory at Universidad Nacional de Costa Rica, based on the method described by Zamora et al. [49].

3.3. Chromatographic Analysis

For the polyphenol quantification, soluble and insoluble strawberry fruit and leaf extracts were analyzed as previously reported [42,50], with slight modifications. The samples were dissolved in 1 mL methanol HPLC-grade, membrane-filtered (0.20 μ m PTFE), and injected (5 μ L) in an ultra-high-performance liquid chromatography system (UHPLC) coupled with a diode-array detector (DAD, Ultimate 3000, series TQH-E1-0288, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Polyphenols were separated on an Acquity UPLC CSH C18 column (1.7 μ m particle size, 100 $\times$ 2.1 mm, Waters) maintained at 30 °C, using acetic acid aqueous solution (7.5 mM, eluent A) and acetonitrile (eluent B) at a flow rate of 0.25 mL min⁻¹. The elution gradient was as follows: isocratic 95% A for 0.8 min, from 95% to 80% A in 5.2 min; isocratic 80% A for 0.5 min, from 80 to 70% A in 1 min; isocratic 70% A for 0.6 min, from 70 to 50% A in 6.9 min, from 50 to 0% A in 3 min; isocratic 0% A for 7.5 min, going back to 95% A in 0.1 min; and running isocratic at 95% A until a 30 min total run. Peaks were recorded and integrated using Chromeleon software (version 7.3, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and identified and quantified using UV-VIS wavelengths and external curves of authentic polyphenols standards (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). At least four replicates were carried out per sample, and each one was injected once for UHPLC-DAD analysis.

Strawberry leaf soluble polyphenol extracts were also analyzed to obtain their untar-geted phytochemical profile using high-resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. Reconstituted samples were measured using a Xevo G2-XS quadrupole time of flight mass (Q-tof) spectrometer (Waters Corporation, Wilmslow, UK) coupled with an Acquity UPLC H-Class. A 5 μ L injection was separated with a BEH-C18 column (2.1 $\times$ 100 mm, 1 μ m) using a mobile phase gradient of A (water, 0.05% formic acid) and B (acetonitrile, 0.05% formic acid), setting a flow of 0.5 mL min⁻¹. The gradient consisted of maintaining 5% B for 5 min, increasing to 80% at 10 min and subsequently to 100% at 11 min, and holding until 13 min to finish equilibrating the column to the initial conditions. The column temperature was set to 50 °C. The mass spectrometer was configured to use a capillary voltage of 2 kV, a 40 V sampling cone, and a source offset of 80 V. The source temperatures were set at 125 °C and 600 °C for the desolvation temperature, and the gas flows were set to 150 L h⁻¹ for the cone gas and to 1000 L h⁻¹ for the desolvation gas. Measurements were made using the MSe acquisition mode in positive and negative polarities, with a mass range from 50 to 1000 m/z , a scan time of 0.25 s, and a ramp of collision energy from 20 V to 40 V for the high-energy function.

The data were analyzed using Progenesis QI v 2.4 software with the Progenesis MetaScope for compound identification, using the referenced databases for polyphenols in food (Phenol-Explorer) [51] and flavonoids (MetabolomicsJP, Arita Laboratory, Uchiyama, Japan) [52]. Compound identification was assigned by matches, considering a mass error lower than 5 ppm, an over 85% isotopic distribution similarity, and the assignment by de novo fragmentation analysis of at least four fragments with a mass error lower than 5. The resulting compounds from the Progenesis QI search were manually curated and evaluated against the MassBank available fragmentation spectra. Tentative identifications were assigned to the matched compounds and described by the compound subclass.

3.4. Cell Viability Assay

SK-MEL-28 (passages 59–70) human melanoma cells (ATCC HTB-72) and NIH/3T3 (passages 20–30) murine fibroblasts (ATCC CRL-1658) were cultured in DMEM (4.5 g/L glucose, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% L-glutamine (4 mM; GIBCO), 1% sodium pyruvate (0.11 mg/mL; Sigma-Aldrich), and 1% antibiotics (10,000 IU/mL penicillin and 10,000 µg/mL streptomycin; GIBCO, Grand Island, NY, USA). All cells were maintained at 95% humidity and 5% CO₂ at 37 °C.

The cytotoxic effect of the total polyphenol strawberry leaf extract in the SK-MEL-28 melanoma cells and the NIH/3T3 normal murine fibroblasts was measured by the neutral red uptake assay according to Repetto et al. [53]. The cells were seeded onto 96-well plates (3×10^4 cells per well) and treated in triplicate for 24 h, with the total polyphenol strawberry leaf extract (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, and 1 mg extract mL⁻¹) diluted in a supplemented culture medium. Neutral red dye (40 µg mL⁻¹, Invitrogen) incorporated into the lysosomes was measured at $\lambda = 540$ nm (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH). A linear dispersion curve of the percentage of cell viability relative to the untreated control was calculated, from which the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined. The data are shown as the mean $\pm$ SD ($n = 9$). Each concentration was compared against the untreated control by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni's post-test (GraphPad Prism, v. 9.4.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.5. Photoprotection Experiment

SK-MEL-28 melanoma cells and NIH/3T3 normal murine fibroblasts were seeded on 24-well plates (1.48×10^6 cells per well) and treated with total polyphenol strawberry leaf extract (0.1 and 0.5 mg extract mL⁻¹) before (24 h in culture medium), after (24 h in culture medium), or during UV irradiation (UVA + UVB 25 mJ cm⁻² in HBSS). Cell viability was measured 24 h after UV irradiation using the MTT assay, as described before [54]. The MTT formazan salts absorbance was measured at $\lambda = 570$ nm (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH), and the percentage of cell viability relative to an untreated control was calculated. The data are shown as the mean $\pm$ SEM ($n = 6$). The effect of each treatment was compared against a control of UV-irradiated cells by a one-way ANOVA, followed by a Bonferroni's post-test (GraphPad Prism, v. 9.4.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.6. Scratch Wound Healing Assay

To evaluate the effect of the total polyphenol strawberry leaf extract on the cell migration and proliferation, SK-MEL-28 and NIH/3T3 cells were seeded in 24-well plates (1.48×10^6 cells per well). A cross-shaped flat wound was scratched in confluent monolayers with a sterile 1000 µL plastic micropipette tip, and monolayers were treated for 72 h with total polyphenol strawberry leaf extract (0.1, 0.2, and 0.5 mg mL⁻¹). The monolayers were photographed every 24 h, and the percentage wound area over time was calculated using Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>, accessed on 15 October 2022). The extract was then removed, and cell viability was measured after 72 h of incubation with fresh media by the MTT assay, as described before [54]. The data are shown as the mean $\pm$ SEM. The effect of each concentration on cell viability (MTT assay) was compared against the untreated control by a one-way ANOVA, followed by a Bonferroni's post-test (GraphPad Prism, v. 9.4.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Discussion

This study compared the phenolic profiles of *Fragaria x ananassa* cv. Festival fruit and leaves from crops cultivated in Costa Rican tropical highlands, showing a 122-fold-higher total polyphenol content and 13-fold higher antioxidant activity (ORAC) in leaves than in fruits, respectively (Table 2). The total polyphenol leaf extracts (70% and 95% ethanol maceration and 70% ethanol infusion) showed the recovery of flavonoids by all extraction protocols, while steroids and terpenoids were absent in all treatments. The 70% ethanol maceration resulted in the highest crude yield (33.76%), the best total polyphenol recovery,

and the highest antioxidant activity, and it was the only method that resulted in alkaloid-free extracts. Similar yields (38%) were obtained by El-Hawary et al. [19] for strawberry leaves using a similar extraction method. Thus, the extract obtained from 70% ethanol maceration at room temperature was selected for the general phytochemical comparison against fruits (Table 2) and for cell culture experiments (Figures 3–5).

Other authors [17–19,22] have also shown higher polyphenolic contents in strawberry leaves compared to those in fruits, mostly ellagitannins. To further characterize the polyphenol profile in strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) fruit and leaves, seven polyphenols (gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, rutin, ellagic acid, and quercetin) were evaluated by UHPLC-DAD (Figure 1, Table 3) in soluble and insoluble polyphenol extractions, also showing higher concentrations in the leaf extracts relative to the fruit. Notably, gallic acid and rutin were the most abundant polyphenols in the insoluble fruit and leaf extracts and in the soluble and total leaf extracts, respectively.

The specific profiles of bioactive polyphenols in strawberry fruit and leaves (Table 1) exhibit wide variations depending on the location, genetics, ripening, growing methods, and harvesting and storage conditions, and the results are dependent on the analytical methods used in each investigation. Nonetheless, anthocyanins, which are rarely found in strawberry leaves [18], have been consistently reported as the most abundant phenolic compounds in strawberry fruits [8,55–58], followed by flavanols, catechins, and procyanidins [55]. In contrast, ellagitannins are the most abundant polyphenols usually reported in strawberry leaves [20,21,24], representing ca. 47.0–54.3% of the total leaf phenolic content [21] and exhibiting up to 14-times-higher total ellagitannins in strawberry leaves ($151.78 \pm 10.66 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) relative to the fruit ($10.73 \pm 1.49 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) [20]. Agrimoniin has been reported as the most abundant ellagitannin in several strawberry varieties [18,20,21]. Other authors have reported cinnamic acid, ferulic acid, and quercetin exclusively in strawberry fruit (cv. Lucy, Joly, Darselect, Selvik, Diana, and Clery), while ellagic acid, kaempferol, and rutin were present only in the leaves of the same varieties [18]. In contrast, Skupień and Oszmiański [59] found quercetin only in the leaves of six strawberry varieties (cv. Kent, Elsanta, Senga, Selva, Elkat, and Dukat). The same authors also observed ellagic acid in the fruit, but in concentrations four times lower than those in the leaves, and the most abundant polyphenols in these varieties were not ellagitannins but *p*-coumaric acid [59]. Gallic acid, caffeic acid [26], and chlorogenic acids [21,24] have also been reported before in strawberry leaves. Several other phytochemicals have been reported to be present in strawberry leaves but absent in the fruits, including terpenes and plant steroids [19], which have been less studied and warrant further investigation.

Some evident peaks remained unidentified in the soluble and total leaf extracts (Figure 1). Due to the lack of purified standards and the vast diversity of the structural isomers of flavonoids, the identification of these compounds in plant extracts is a challenge that needs strategies for the proper assignment of tentative identifications [60]. High-resolution mass spectrometry allows for the assignment of an elemental composition to adduct ions within 5 ppm of the mass error, and, combining it with tandem fragmentation spectra, it is possible to assign a putative identification to relevant features. Following the nomenclature by Domon and Costello [61] for proposed flavonoid glycosides, it is possible to characterize fragmentation patterns to obtain more specific information about flavonoids aglycones substituents (Figure 6). This allowed for the identification of different flavonoids families in the soluble leaf extract: flavanols, flavans, flavones, and anthocyanins.

Due to the cleavage of O–C bonds, glycosylated flavonoids present a fragmentation leading to Y_0^- or Y_0^+ ions as the main product ions. In negative and positive ionization modes, the formation of ions losses for an O-hexose $[M-162 \pm H]^{+/-}$, O-deoxyhexose $[M-146 \pm H]^{+/-}$, and O-pentose $[M-132 \pm H]^{+/-}$ allows for the determination of the glycan size and structure [60]. Additionally, the characteristic product ions of acyl groups commonly occurring in the glycosyl part of flavonoids are also key to the assignment of a tentative structure to detected features. Neutral losses for malonyl $[M+H-86]^+$, galloyl

[M+H-152]⁺, gallic acid [M+H-170]⁺, coumaroyl [M+H-146]⁺, and feruloyl [M+H-176]⁺, among others, complement the assignment of defined identifications [62].

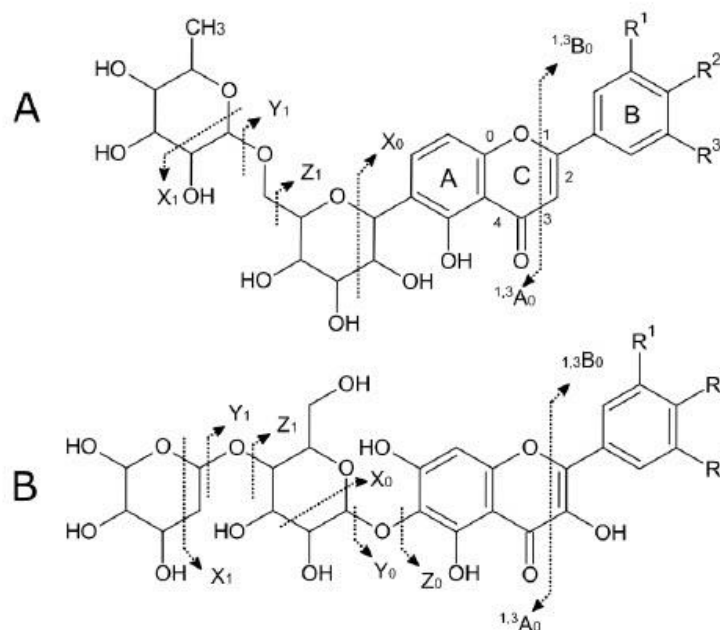
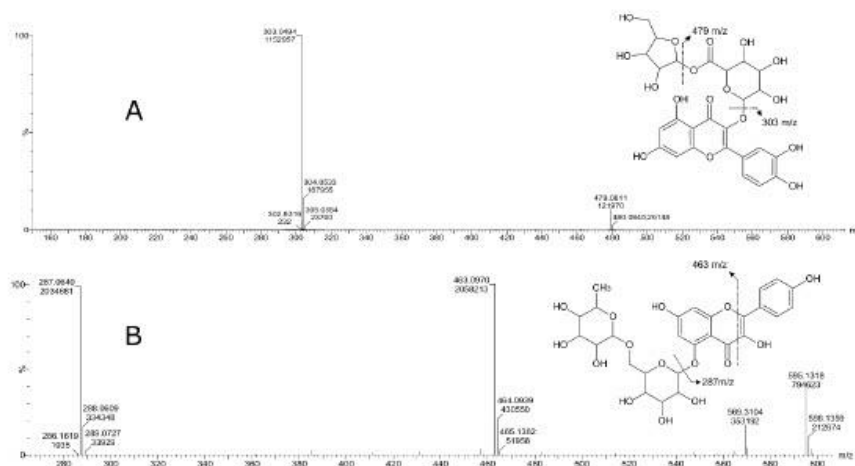


Figure 6. Nomenclature and common product ions of flavones and flavonols C-glycosides (A) and O-glycosides (B).

Accordingly, compound 2 (Figure 2, Table 4) presents a 271 *m/z* ion as a neutral loss of 162 corresponding to the loss of a hexose from the glycosylated pelargonidin. Compound 3 presents fragmentation ions 465 *m/z* and 303 *m/z* corresponding to feruloyl [M+H-176]⁺ and O-hexose [M-162+H]⁺ neutral losses, where the 303 *m/z* ion corresponds to the protonated quercetin aglycone. Compound 4 was also assigned to a quercetin aglycone that presented 479 *m/z* and 303 *m/z* fragments corresponding to O-pentose [M-132+H]⁺ and feruloyl [M+H-176]⁺ neutral losses, respectively (Figure 7A). Compound 5 presents a neutral loss corresponding to the loss of one O-hexose [M-162+H]⁺ from an anthocyanin glycoside. Compound 6 presented the formation of A₀ and Y₀ fragments, kaempferol 7-O-rutinoside being the only known structure to present that possible elemental composition considering the formation of the 287 *m/z* product ion of the protonated kaempferol aglycone (Figure 7B). Compound 7 presented an [M+H-176]⁺ neutral loss due to the presence of a glucuronide, and the designation of a kaempferol aglycone was confirmed by pseudo MSⁿ spectra with the fragmentation of the 287 *m/z* ion and its comparison to the MassBank reference MS/MS spectra of lutein and kaempferol, as kaempferol presents fragments with masses of 165 *m/z* and 153 *m/z*, as observed for compound 7. Compound 8 was identified as a quercetin 3-glucuronide with an [M+H-176]⁺ neutral loss, and compound 9 was identified as a kaempferol 3-(6'-p-coumaroyl glucoside) with the neutral loss of the coumaryl galactoside group [M+H-162-146]⁺.



must be considered in future studies to determine if topical applications may be restricted to the epidermis.

Interestingly, Zhu et al. [22] reported total polyphenols in strawberry roots (179.2 ± 13.0 mg GAE g^{-1} DW) and flowers (181.8 ± 13.3 mg GAE g^{-1} DW) in similar or even higher concentrations than those in the leaves (117.1 ± 2.7 mg GAE g^{-1} DW), as well as ca. three-times-higher antioxidant activity in the flowers. This suggests that other underutilized parts of the strawberry plant may also hold relevant bioactive and commercial potential, which is of interest for future studies.

5. Conclusions

Given their higher total polyphenol content and superior antioxidant activity relative to fruits, underutilized strawberry (*Fragaria x ananassa*) cv. Festival leaves from crops cultivated in Costa Rican tropical highlands are a potential source of apparently abundant biomass with relevant bioactive potential, including possible photoprotective and anti-proliferative activities. However, before considering eventual topical applications, future experiments with normal human epidermal and dermal cells and tissues are necessary to evaluate aspects such as the absorption, distribution, metabolism, and stability of the leaf components, as well as in understanding the molecular mechanisms involved in normal skin tissue responses to this extract.

Author Contributions: L.A.C.-C. and K.S.-A. designed the study. L.A.C.-C., B.S.-M., K.S.-A. and F.V.-R. prepared the extracts and conducted the general phytochemical analysis. K.S.-A., A.I.-M. and A.S.-K. conducted the HPLC analysis. R.H.-M. conducted the cell culture experiments. L.A.C.-C., K.S.-A. and F.V.-R. wrote the first draft, and all authors read, edited, and approved the final manuscript. F.V.-R. is responsible for the final content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was funded by Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets from the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank our research students, Amanda Carvajal-Campos and María Fernanda Brenes-Zárate, for their valuable technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interest.

Sample Availability: Not available.

References

1. FAO, FAOStat. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2021. Available online: <https://www.fao.org> (accessed on 25 May 2022).
2. Simpson, D. The Economic Importance of Strawberry Crops. In *Genomes Rosaceous Berries Their Wild relatives*; Compend. Plant Genomes.; Hytönen, T., Graham, J., Harrison, R., Eds.; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 1–7. [CrossRef]
3. Kirschbaum, D.; Jerez, E.; Salazar, S.; Borquez, A.; Meneguzzi, N.; Agüero, J.; Conci, V.; Conci, L.; Salame, T.; Santos, B. Causes of non-marketable fruit production throughout the strawberry harvest season in subtropical environments. *Acta Hort.* **2014**, *1049*, 887–892. [CrossRef]
4. Villamil-Galindo, E.; Van de Velde, E.; Piagentini, A. Strawberry agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds: Effect of cultivar on the phenolic profile and the antioxidant capacity. *Bioresour. Bioprocess.* **2021**, *8*, 61. [CrossRef]
5. Rodríguez-Gutiérrez, G.; Cardoso, J.C.; Rubio-Senent, E.; Serrano, A.; Borja, R.; Fernández-Bolaños, J.; Fermojo, F. Thermally-treated strawberry extrudate: A rich source of antioxidant phenols and sugars. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *51*, 186–193. [CrossRef]

6. Vázquez-González, M.; Fernández-Prior, Á.; Oria, A.B.; Rodríguez-Juan, E.; Pérez-Rubio, A.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G. Utilization of strawberry and raspberry waste for the extraction of bioactive compounds by deep eutectic solvents. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *130*, 109645. [CrossRef]
7. Šaponjac, V.T.; Gironés-Vilaplana, A.; Djilas, S.; Mena, P.; Četković, G.; Moreno, D.; Čanadanović-Brunet, J.; Vulić, J.; Stajčić, S.; Vinčić, M. Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 5397–5405. [CrossRef]
8. Cubero-Cardoso, J.; Serrano, A.; Trujillo-Reyes, Á.; Villa-Gómez, D.K.; Borja, R.; Fermo, F. Valorization Options of Strawberry Extrudate Agro-Waste: A Review. In *Innovation in the food Sector through Valorization Food Agro-Food by-Products*; de Barros, A., Gouvêas, L., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2021; pp. 1–20. [CrossRef]
9. Afrin, S.; Gasparrini, M.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Reboredo-Rodríguez, P.; Mezzetti, B.; Varela-López, A.; Giampieri, F.; Battino, M. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4435–4449. [CrossRef] [PubMed]
10. Basu, A.; Nguyen, A.; Betts, N.M.; Lyons, T.J. Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 790–806. [CrossRef] [PubMed]
11. Fierascu, R.C.; Temocico, G.; Fierascu, I.; Orta, A.; Babeanu, N.E. *Fragaria* Genus: Chemical Composition and Biological Activities. *Molecules* **2020**, *25*, 498. [CrossRef] [PubMed]
12. Forbes-Hernandez, T.Y.; Gasparrini, M.; Afrin, S.; Bompadre, S.; Mezzetti, B.; Quiles, J.L.; Giampieri, F.; Battino, M. The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, S46–S59. [CrossRef] [PubMed]
13. Giampieri, F.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Gasparrini, M.; Afrin, S.; Cianciosi, D.; Reboredo-Rodríguez, P.; Varela-Lopez, A.; Quiles, J.L.; Mezzetti, B.; Battino, M. The healthy effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1398*, 62–71. [CrossRef] [PubMed]
14. Giampieri, F.; Alvarez-Suarez, J.M.; Battino, M. Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3867–3876. [CrossRef]
15. Giampieri, F.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Gasparrini, M.; Alvarez-Suarez, J.M.; Afrin, S.; Bompadre, S.; Quiles, J.L.; Mezzetti, B.; Battino, M. Strawberry as a health promoter: An evidence based review. *Food Funct.* **2015**, *6*, 1386–1398. [CrossRef] [PubMed]
16. Miller, K.; Feucht, W.; Schmid, M. Bioactive Compounds of Strawberry and Blueberry and Their Potential Health Effects Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview. *Nutrients* **2019**, *11*, 1510. [CrossRef] [PubMed]
17. Kärnlund, A.; Harhineva, K.; Lehtonen, M.; McDougall, G.J.; Stewart, D.; O Karjalainen, R. Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2182–2190. [CrossRef] [PubMed]
18. Michalska, A.; Carlen, C.; Heritier, J.; Andlauer, W. Profiles of bioactive compounds in fruits and leaves of strawberry cultivars. *J. Berry Res.* **2017**, *7*, 71–84. [CrossRef]
19. El-Hawary, S.S.; Mohammed, R.; El-Din, M.E.; Hassan, H.M.; Ali, Z.Y.; Rateb, M.E.; El Naggat, E.M.B.; Othman, E.M.; Abdelmohsen, U.R. Comparative phytochemical analysis of five Egyptian strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) and antidiabetic potential of Festival and Red Merlin cultivars. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 16755–16767. [CrossRef]
20. Karlínska, E.; Masny, A.; Cieślak, M.; Macierzynski, J.; Pecio, L.; Stochmal, A.; Kosmala, M. Ellagitannins in roots, leaves, and fruits of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) vary with developmental stage and cultivar. *Sci. Hortic.* **2021**, *275*, 109665. [CrossRef]
21. Kärnlund, A.; Salminen, J.-P.; Koskinen, P.; Ahern, J.R.; Karonen, M.; Tiliakkala, K.; Karjalainen, R.O. Polyphenols in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Leaves Induced by Plant Activators. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4592–4600. [CrossRef]
22. Zhu, Q.; Nakagawa, T.; Kishikawa, A.; Ohnuki, K.; Shimizu, K. In vitro bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (*Fragaria × ananassa* var. Amaou). *J. Funct. Foods* **2015**, *13*, 38–49. [CrossRef]
23. Ferlemi, A.-V.; Lamari, F.N. Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value. *Antioxidants* **2016**, *5*, 17. [CrossRef]
24. Fecka, I.; Bednarska, K.; Włodarczyk, M. *Fragaria × ananassa* cv. Senga Sengana Leaf: An Agricultural Waste with Anticancer Potential and High Content of Ellagitannins, Flavonols, and 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic Acid. *Molecules* **2022**, *27*, 5293. [CrossRef] [PubMed]
25. European Medicines Agency, Wild Strawberry leaf *Fragaria*. 2019. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/fragariae-folium> (accessed on 20 November 2022).
26. Skupień, K.; Oszmiański, J.; Kostrzewa-Nowak, D.; Tarasiuk, J. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Lett.* **2006**, *236*, 282–291. [CrossRef] [PubMed]
27. Cvetković, D.J.; Stanojević, L.P.; Stanković, M.Z.; Cakić, M.D.; Savić, S.R.; Miljković, M.D. Antioxidant activity of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) leaves. *Sep. Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1039–1051. [CrossRef]
28. Wang, S.Y.; Lin, H.-S. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 140–146. [CrossRef]
29. Al-Deen, A.; Al-Naqeb, G.; Al-Maqdari, Q. Investigation of antioxidant and antibacterial effects of *Dodonaea viscosa*, *Fragaria × ananassa* duch and *Vernonia amygdalina* leaves. *Aden Univ. J.* **2013**, *17*, 1–14.

30. Takács, I.; Szekeres, A.; Takács, Á.; Rakk, D.; Mézes, M.; Polyák, Á.; Lakatos, L.; Gyémánt, G.; Csupor, D.; Kovács, K.J.; et al. Wild Strawberry, Blackberry, and Blueberry Leaf Extracts Alleviate Starch-Induced Hyperglycemia in Prediabetic and Diabetic Mice. *Planta Medica* **2020**, *86*, 790–799. [\[CrossRef\]](#)
31. Zhang, L.; Ma, Q.; Zhou, Y. Strawberry Leaf Extract Treatment Alleviates Cognitive Impairment by Activating Nrf2/HO-1 Signaling in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 201. [\[CrossRef\]](#)
32. Moustafa, N.; El-Mallah, M.; Hamdy, H. Protective Effect of Strawberry Leaves Against Nephrotoxicity of Male Rats. *Egypt. J. Appl. Sci.* **2021**, *36*, 121–129. [\[CrossRef\]](#)
33. Mohamed, N.E.; Ashour, S.E. Influence of ethanolic extract of strawberry leaves for abrogating bromate hazards in male rats. *J. Basic Appl. Zool.* **2019**, *80*, 19. [\[CrossRef\]](#)
34. Duru, M. Effects of dietary strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaf powder on egg yield, quality and egg yolk cholesterol in laying hens. *J. Food Agric. Environ.* **2013**, *11*, 477–480.
35. Chandler, C.; Legard, D.; Dunigan, D.D.; Crocker, T.; Sims, C. ‘Strawberry Festival’ Strawberry. *Hortscience* **2000**, *35*, 1366–1367. [\[CrossRef\]](#)
36. Pineli, L.D.L.D.O.; Moretti, C.L.; dos Santos, M.S.; Campos, A.B.; Brasileiro, A.V.; Córdova, A.C.; Chiarello, M.D. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 11–16. [\[CrossRef\]](#)
37. Wojdyło, A.; Figiel, A.; Oszmianański, J. Effect of Drying Methods with the Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1337–1343. [\[CrossRef\]](#)
38. Klopotek, Y.; Otto, K.; Böhm, V. Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5640–5646. [\[CrossRef\]](#)
39. Sharma, R.R.; Singh, D. Phenolic Content Pattern, Polyphenol Oxidase and Lipoygenase Activity in Relation to Albinism, Fruit Malformation and Nubbins Production in Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **2010**, *19*, 67–72. [\[CrossRef\]](#)
40. Sato, T.; Ikeya, Y.; Adachi, S.-I.; Yagasaki, K.; Nihei, K.-I.; Itoh, N. Extraction of strawberry leaves with supercritical carbon dioxide and entrainers: Antioxidant capacity, total phenolic content, and inhibitory effect on uric acid production of the extract. *Food Bioprod. Process.* **2019**, *117*, 160–169. [\[CrossRef\]](#)
41. Calvo-Castro, L.A.; Lobo-Vázquez, M.; Gómez-González, J.C.; Arnáez-Serrano, E.; Zamora-Fallas, G.; Sánchez-Zúñiga, K.; Centeno-Cerdas, C. Bioactive potential of tropical highland apple (*Malus domestica* cv. Anna) crude extract: Opportunities for food waste revalorization. *Futur. J. Pharm. Sci.* **2022**, *8*, 57. [\[CrossRef\]](#)
42. Lux, P.E.; Freiling, M.; Stuetz, W.; von Tucher, S.; Carle, R.; Steingass, C.B.; Frank, J. (Poly)phenols, Carotenoids, and Tocochromanols in Corn (*Zea mays* L.) Kernels As Affected by Phosphate Fertilization and Sowing Time. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 612–622. [\[CrossRef\]](#)
43. Harborne, J. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1984; Available online: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-009-5570-7> (accessed on 3 May 2021). [\[CrossRef\]](#)
44. Krishnaswamy, N.R. *Chemistry of Natural Products: A Laboratory Handbook*; Universities Press: Hyderabad, India, 2003.
45. Rojas-Garbanzo, C.; Pérez, A.M.; Vaillant, E.; Pineda-Castro, M.L. Physicochemical and antioxidant composition of fresh peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) fruits in Costa Rica. *Braz. J. Food Technol.* **2016**, *19*, e2015097. [\[CrossRef\]](#)
46. Fernandes, F.H.A.; de Batista, R.S.; De Medeiros, E.D.; Santos, E.S.; Medeiros, A.C.D. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25*, 208–211. [\[CrossRef\]](#)
47. Sumanta, N.; Haque, C.; Nishika, J.; Suprakash, R. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **2014**, *4*, 63–69. Available online: <http://www.isca.in/rjcs/Archives/v4/i9/12.ISCA-RJCS-2014-146.php> (accessed on 8 November 2021).
48. Wang, J.; Wang, J.; Ye, J.; Vanga, S.K.; Raghavan, V. Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control.* **2019**, *96*, 128–136. [\[CrossRef\]](#)
49. Zamora, G.; Beukelman, K.; Berg, B.; Arias, M.; Umana, E.; Aguilar, I.; Ufford, L.; Worm, E.; Fallas, N.; Solorzano, R. The antioxidant capacity and immunomodulatory activity of stingless bee honeys proceeding from Costa Rica. *Oxid. Antioxidants Med. Sci.* **2015**, *4*, 49–55. [\[CrossRef\]](#)
50. Fratianni, F.; Cardinale, F.; Cozzolino, A.; Granese, T.; Albanese, D.; Di Matteo, M.; Zaccardelli, M.; Coppola, R.; Nazzaro, F. Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *J. Fund. Foods* **2014**, *7*, 551–557. [\[CrossRef\]](#)
51. Neveu, V.; Pérez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; et al. Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**, *2010*, bap024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Arita, M.; Suwa, K. Search extension transforms Wiki into a relational system: A case for flavonoid metabolite database. *BioData Min.* **2008**, *1*, 7. [\[CrossRef\]](#)
53. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [\[CrossRef\]](#)

54. Calvo-Castro, L.; Syed, D.N.; Chamcheu, J.C.; Vilela, F.M.P.; Pérez, A.M.; Vaillant, E.; Rojas, M.; Mukhtar, H. Protective Effect of Tropical Highland Blackberry Juice (*Rubus adenatrichos* Schltdl.) Against UVB-Mediated Damage in Human Epidermal Keratinocytes and in a Reconstituted Skin Equivalent Model. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 1199–1207. [\[CrossRef\]](#)
55. Aaby, K.; Mazur, S.; Arnfinn Nes, A.; Skrede, G. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem.* **2012**, *132*, 86–97. [\[CrossRef\]](#)
56. Hernanz, D.; Recamales, Á.F.; Meléndez-Martínez, A.J.; González-Miñet, M.L.; Heredia, F.J. Assessment of the Differences in the Phenolic Composition of Five Strawberry Cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) Grown in Two Different Soilless Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1846–1852. [\[CrossRef\]](#)
57. Tulipani, S.; Mezzetti, B.; Capocasa, F.; Bompadre, S.; Beekwilder, J.; de Vos, C.H.R.; Capanoglu, E.; Bovy, A.; Battino, M. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 696–704. [\[CrossRef\]](#)
58. Kim, S.K.; Kim, D.S.; Kim, D.Y.; Chun, C. Variation of bioactive compounds content of 14 oriental strawberry cultivars. *Food Chem.* **2015**, *184*, 196–202. [\[CrossRef\]](#)
59. Skupień, K.; Oszmiański, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 66–70. [\[CrossRef\]](#)
60. Wang, M.; Yao, C.; Li, J.; Wei, X.; Xu, M.; Huang, Y.; Mei, Q.; Guo, D.-A. Software Assisted Multi-Tiered Mass Spectrometry Identification of Compounds in Traditional Chinese Medicine: *Dalbergia odorifera* as an Example. *Molecules* **2022**, *27*, 2333. [\[CrossRef\]](#)
61. Domon, B.; Costello, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **1988**, *5*, 397–409. [\[CrossRef\]](#)
62. Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 312–321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Ziemińska, A.; Nizioł-Lukaszewska, Z.; Zagórska-Dziok, M.; Bujak, T.; Wójcik, M.; Sowa, I. Evaluation of Cosmetic and Dermatological Properties of Kombucha-Fermented Berry Leaf Extracts Considered to Be By-Products. *Molecules* **2022**, *27*, 2345. [\[CrossRef\]](#)
64. Markiewicz, A.; Zasada, M.; Erkiert-Polgaj, A.; Wieckowska-Szakiel, M.; Budzisz, E. An evaluation of the antiaging properties of strawberry hydrolysate treatment enriched with L-ascorbic acid applied with microneedle mesotherapy. *J. Cosmet. Dermatol.* **2018**, *18*, 129–135. [\[CrossRef\]](#)
65. Gasparrini, M.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Afrin, S.; Alvarez-Suarez, J.M.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Bompadre, S.; Quiles, J.L.; Mezzetti, B.; Giampieri, F. A Pilot Study of the Photoprotective Effects of Strawberry-Based Cosmetic Formulations on Human Dermal Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17870–17884. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Gasparrini, M.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Afrin, S.; Reboredo-Rodríguez, P.; Cianciosi, D.; Mezzetti, B.; Quiles, J.L.; Bompadre, S.; Battino, M.; Giampieri, F. Strawberry-Based Cosmetic Formulations Protect Human Dermal Fibroblasts against UVA-Induced Damage. *Nutrients* **2017**, *9*, 605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Afrin, S.; Forbes-Hernandez, T.; Giampieri, F.; Battino, M.; Gasparrini, M. The photoprotective effects of strawberry-based cosmetic formulations on human dermal fibroblasts. *Acta Hort.* **2017**, *1156*, 397–404. [\[CrossRef\]](#)
68. Nordin, M.L.; Kadir, A.A.; Zakaria, Z.A.; Abdullah, R.; Abdullah, M.N.H. In vitro investigation of cytotoxic and antioxidative activities of *Ardisia crista* against breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Gado, F.; Digiacomo, M.; Salsano, J.E.; Macchia, M.; Manera, C. Phenolic Compounds in Prevention and Treatment of Skin Cancers: A Review. *Curr. Med. Chem.* **2021**, *28*, 6730–6752. [\[CrossRef\]](#)
70. Nichols, J.A.; Katiyar, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* **2010**, *302*, 71–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Potapovich, A.I.; Kostyuk, V.A.; Kostyuk, T.V.; de Luca, C.; Korkina, L.G. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflamm. Res.* **2013**, *62*, 773–780. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo 5. Artículo 3 (publicado)



Article

Eliciting Polyphenols in Strawberry Leaves: Preliminary Experiments in *Fragaria x ananassa* cv. Festival

Karla Salas-Arias ^{*,†}, Andrea Irias-Mata [‡], Laura Sánchez-Calvo [§], María Fernanda Brenes-Zárate [¶], Ana Abdelnour-Esquivel [¶], Fabián Villalta-Romero ^{¶*} and Laura A. Calvo-Castro ^{¶*}

^{*} Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica. ORCID: 0000-0002-9772-1693 (KSA).

[†] Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. ORCID: 0000-0002-1110-2067 (MFBZ), 0000-0002-8951-685X (AAE), 0000-0001-7484-8125 (FVR), 0000-0001-5101-9105 (LACC).

[‡] Centro para Investigaciones en Genes y Semillas, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. ORCID: 0000-0003-3789-3247 (AIM).

[§] Escuela de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. ORCID: 0000-0001-9637-627X (LSC).

[¶] Shared senior authorship on this paper.

Correspondence: Laura A. Calvo-Castro, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 150-7050. Phone: +506 2530 9411. e-mail: ancalvo@itcr.ac.cr

Abstract: Polyphenols are plant secondary metabolites, which function mostly as a general stress-induced protective mechanism. Polyphenols have also gained interest due to their beneficial properties on human health. Strawberry leaves represent an agro-industrial waste material with relevant bioactive polyphenol content, which could be incorporated into circular economy strategies. However, due to their low amounts in plants, polyphenol production needs to be improved for cost-effective applications. The objective of this research was to compare polyphenol production in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaves in plants grown in greenhouse conditions and plants grown *in vitro*, using three possible elicitor treatments (UV irradiation, cold exposure, and cysteine). General vegetative effects were morphologically evaluated, and specific polyphenolic compounds were quantified by UHPLC-DAD-MS/MS. Gallic acid was the most abundant polyphenol found in the leaves, both *in vivo* and *in vitro*. Results showed higher amounts and faster accumulation of polyphenols in the *in vitro* regenerated plants, highlighting the relevance of *in vitro* tissue culture strategies for producing compounds such as polyphenols in this species and cultivar.

Keywords: elicitors; leaves; polyphenols; strawberry

1. Introduction

Polyphenols are plant secondary metabolites involved in plant growth and development processes, and they can accumulate in plants in response to several environmental biotic and abiotic stressors (Sharma et al., 2019). Polyphenols are also interesting for their capacities to regulate human metabolism and to promote human health (Rasouli et al., 2017; Cory et al., 2018; Fraga et al., 2019). However, plant secondary metabolites account for less than 1% of plants dry weight, which dissatisfies the commercial demand (Bhaskar et al., 2022). Moreover, the industrial production of polyphenols has been limited by their difficult extraction and costly synthesis, due to their complex structures characterized by the union of several phenolic groups with very specific stereochemistry and variable polarity (Halder et al., 2019; Hano & Tungmunlithum, 2020; Qin et al., 2021).

Strawberries (*Fragaria x ananassa*) are a worldwide-available fruit with relevant polyphenol content (Gündüz, 2015; Piarascu et al., 2020) and known bioactive properties (Giampieri et al., 2015; Afrin et al., 2016). From a global production of over 12 million tons

per year, circa 20% of strawberry production corresponds to vegetative waste, which is generally discarded (Villamil-Galindo et al., 2020, 2021). Nonetheless, strawberry leaves have been found to exhibit higher polyphenol content and higher antioxidant activity than strawberry fruits, representing a presumably relevant source of unexploited bioactive biomass (Salas-Arias et al., 2023). Furthermore, as a temperate crop, tropical highland strawberry crops have been less studied, even though increased polyphenol accumulation and diversity has been shown to occur in other crops under the higher temperatures, longer photoperiods, and increased UV irradiation conditions of lower latitudes (Calvo-Castro et al., 2022).

The quantity and quality of polyphenols in plants depend on several factors such as genetics, growth conditions (light, temperature, humidity, soil, salinity), physiological maturity, processing and storage (Li et al., 2012; Sharma et al., 2019). Several biotechnological production systems have been tested for enhancing plant metabolites yield, including selection of high-yielding lines; plant cell, tissue and organ culture; precursor feeding; elicitation; large-scale cultivation in bioreactor systems; genetic engineering; and biotransformation (Wilson & Roberts, 2012; M. Al Khayri & M. Naik, 2016; Marchev et al., 2020; Bhaskar et al., 2022). Several strategies have been tested on strawberry crops to enhance plant growth and quality (reviewed in (Garza-Alonso et al., 2022)). However, most studies have focused on the fruit.

Besides from collecting strawberry leaves at the end of each crop cycle, and to avoid hurting strawberry fruit (the economical- and nutritional-relevant product) quality and yield, vegetative polyphenol production could be exploited and even enhanced via *in vitro* plant and tissue culture systems, together with the use of exogenous biotic or abiotic elicitors to induce plant secondary metabolism responses, which may result in increased production or in new forms of bioactive compounds (M. Al Khayri & M. Naik, 2016; Khan et al., 2021; Bhaskar et al., 2022; Guru et al., 2022). Previous studies in strawberry crops have achieved enhanced leaf size and number and increased phenolics and antioxidant capacity using elicitors such as humic substances, protein hydrolysates, microbial supplementation (microalgae, bacteria, fungi), plant extracts, biopolymers (e.g. chitosan), minerals, diverse nanoparticle and compost formulations, and abiotic stimulants such as ultraviolet (UV) and visible light, heat, cold, and magnetic field exposure (reviewed in (Garza-Alonso et al., 2022)).

For this study, we conducted a preliminary evaluation of polyphenol production in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaves from plants regenerated *in vitro* with three easy-to-implement and inexpensive elicitor treatments (UV irradiation, low overnight temperatures, and foliar cysteine), and compared their polyphenol content with those of leaves from plants grown in greenhouse conditions in a tropical highland environment. To the best of our knowledge, this is the first report showing polyphenol elicitation in the leaves of strawberry cv. Festival from Costa Rica.

2. Results and Discussion

For establishing the plants *in vitro*, two disinfection protocols (Table 6) were applied to strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) apical and axillary runners ($n = 24$, each) from greenhouse plants. Disinfectant Gamba Oxi was more effective ($81.67 \pm 15.04\%$ and $91.00 \pm 2.00\%$ apical and axillary runners success, respectively) for the elimination of contaminants than treatment with chlorine ($68.33 \pm 15.95\%$ and $65.00 \pm 6.08\%$ apical and axillary runners success, respectively). Overall, success rates were very similar between apical ($75.00 \pm 15.67\%$) and axillary ($78.00 \pm 14.81\%$) explants. Micropropagation of the established *in vitro* strawberry plants in MS medium supplemented with 0.5, 1, and 1.5 mg/L BAP showed sprouting with roots in all concentrations after 6 weeks. However, *in vitro* plants with 0.5 mg L⁻¹ BAP had slightly better qualitative morphological development, and subsequent culture was continued only with this formulation. After 12 weeks, two

generations (P1-P2) were produced, corresponding to 105 *in vitro* plants with a yield percentage of 95.8%.

Total polyphenol content (mg GAE g⁻¹ dry weight) in the *in vitro* and *in vivo* strawberry plants (*F. x ananassa* cv Festival) treated with UV irradiation, cold exposure and cysteine for 15 days was very similar to their respective untreated controls (Table 1). However, total polyphenol content was about 2 times higher in the *in vitro* plants relative to the greenhouse-grown seedlings. Increased or differential biosynthesis and accumulation of secondary metabolites in the *in vitro* regenerated plants relative to their *in vitro* or *ex vitro* counterparts has been reported in other plants (reviewed in Matkowski, 2008) highlighting the relevance of this biotechnological strategy for producing compounds such as polyphenols in higher amounts and faster than in conventional crops.

Table 1. Total polyphenol content (mean $\pm$ SD) determined by the Folin-Ciocalteu method in strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) leaves after 15 days treatment with three elicitors (UV irradiation, cold exposure, and cysteine) *in vitro* (n = 3, except for control) and *in vivo* (n = 6).

Treatment	Total polyphenols (mg GAE g ⁻¹ DW)	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Untreated control	212.27*	116.18 $\pm$ 17.06
UVC (254 nm)	250.45 $\pm$ 119.94	117.54 $\pm$ 13.94
Cold (4° C)	203.33 $\pm$ 35.09	112.77 $\pm$ 19.12
Cysteine (200 mg L ⁻¹)	215.90 $\pm$ 81.30	110.54 $\pm$ 16.75

DW, dry weight. *Due to low biomass, all ten replicates had to be pooled together for analysis. There were no statistical differences ($p < 0.05$) between treatments *in vitro* (two-tailed unpaired *t* test; GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Although total polyphenol production was apparently not affected by the elicitor treatments, there were differences in the specific polyphenols detected and quantified by UHPLC-MS/MS-DAD. Six polyphenols were identified and quantified in the leaves from both *in vitro* and *in vivo* plants (gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ellagic acid, and quercetin) (Tables 3 and 4). Two other polyphenols, rutin and (+)-catechin, were present only in the *in vitro* (in trace amounts) or in the *in vitro* plants, respectively. As reported before for this cultivar (Salas-Arias et al., 2023), gallic acid was the most abundant polyphenol found in the leaves, both *in vitro* (in the insoluble fraction) and *in vitro*, in most treatments (except for the cysteine-treated *in vitro* plants, where rutin was the more abundant polyphenol). Moreover, in accordance with the total polyphenol results, gallic acid concentrations were also higher in the *in vitro* plants (Table 2) relative to the greenhouse-grown seedlings (Table 3).

Table 2. Specific polyphenols (mean $\pm$ SEM; $n = 3$) in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaves from in vitro plants determined by UHPLC-DAD-MS/MS after 15-days treatment with three elicitors (UVC irradiation, overnight 4 °C exposure, and 200 mg L⁻¹ cysteine).

Peak	Compound	Retention time (min)	UV/Vis wavelength (nm)	[M-H] ⁻ Ion products (m/z)	Polyphenol concentration in $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW			
					Control	UVC (254 nm)	Cold (4 °C)	Cysteine (200 mg L ⁻¹)
1	Gallic acid	2.06	201/220/270	169:79,81,125	132.48	355.34 $\pm$ 69.43	690.03 $\pm$ 250.47	379.62 $\pm$ 38.53
2	(+)-Catechin	7.13	201/278	289:203, 205, 245	0.0019	0.003 $\pm$ 0.0006	0.002 $\pm$ 0.0003	0.002 $\pm$ 0.0001
3	Caffeic acid	8.51	216/240/322	179:107, 117, 135	9.99	49.95 $\pm$ 9.77	96.93 $\pm$ 31.47	55.81 $\pm$ 12.20
4	Chlorogenic acid	8.69	215/320	353: 135, 179, 191	n.d.	15.05 $\pm$ 1.36	14.18 $\pm$ 0.81	6.66 $\pm$ 1.39
5	p-coumaric acid	10.51	209/310	163:93, 117, 119	11.30	26.13 $\pm$ 4.39	31.53 $\pm$ 14.87	39.00 $\pm$ 14.02
7	Ellagic acid	11.15	196/254/366	301: 185, 229, 257	11.39	22.58 $\pm$ 5.56	14.66 $\pm$ 9.25	18.45 $\pm$ 2.84
8	Quercetin	13.91	201/255/370	301: 121, 151	23.82	n. d.	n. d.	361.79 $\pm$ 54.98

n.d. = not detected. Due to low biomass, the dried leaves were pooled in three groups of ten replicates each, yielding only one control pooled sample. There were no significant differences between elicitor treatments at $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test within each row; GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Table 3. Specific polyphenols (mean $\pm$ SEM; $n = 4$) in soluble (free) and insoluble (bound) polyphenol fractions of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaves from greenhouse-grown seedlings determined by UHPLC-DAD-MS/MS after 15-days treatment with three separate elicitors (UVC irradiation at 254 nm, overnight 4 °C exposure, and 200 mg L⁻¹ foliar cysteine).

Peak	Compound	Retention time (min)	UV/Vis wavelength (nm)	[M-H] ⁻ Ion products (m/z)	Polyphenol concentration in $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW extract					
					Insoluble fraction			Soluble fraction		
					UVC	Cold	Cysteine	UVC	Cold	Cysteine
1	Gallic acid	2.06	201/220/270	169:79,81,125	35.01 $\pm$ 6.74	51.17 $\pm$ 11.49	5.47 $\pm$ 0.72	0.58 $\pm$ 0.26	0.35 $\pm$ 0.12	0.26 $\pm$ 0.03
3	Caffeic acid	8.51	216/240/322	179:107, 117, 135	2.41 $\pm$ 0.58	3.66 $\pm$ 0.56	2.03 $\pm$ 0.56	0.36 $\pm$ 0.27	0.37 $\pm$ 0.08	3.66 $\pm$ 0.56
4	Chlorogenic acid	8.69	215/320	353: 135, 179, 191	n.d.	2.61 $\pm$ 0.75	n.d.	1.30 $\pm$ 0.66	0.51 $\pm$ 0.15	0.82 $\pm$ 0.22
5	p-coumaric acid	10.51	209/310	163:93, 117, 119	2.31 $\pm$ 0.23	14.32 $\pm$ 6.33	1.61 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.36	0.35 $\pm$ 0.17
6	Rutin	10.63	201/256/355	609: 151, 255, 271, 300, 301	30.52 $\pm$ 3.02	37.92 $\pm$ 14.13	19.87 $\pm$ 1.30	4.36 $\pm$ 0.67	1.89 $\pm$ 0.65	3.52 $\pm$ 0.43
7	Ellagic acid	11.15	196/254/366	301: 185, 229, 257	0.65 $\pm$ 0.29	10.12 $\pm$ 4.50	0.76 $\pm$ 0.40	0.01 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.19	0.001 $\pm$ 0.001
8	Quercetin	13.91	201/255/370	301: 121, 151	n.d.	44.19 $\pm$ 9.37	n.d.	0.13 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01

n.d. = not detected. There were no significant differences between elicitor treatments at $p < 0.05$. (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test within each row; GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Of note, chlorogenic acid was found only in elicitor-treated plants, and quercetin was present *in vitro* only in the cysteine-treated plants, in concentrations 15 times higher than in the untreated control. (+)-Catechin and chlorogenic acid were also absent in untreated greenhouse-grown strawberry (*F. x ananassa* cv Festival) leaves in a previous report, where quercetin was also found in much lower concentrations (Salas-Arias et al., 2023). These three compounds warrant further investigations in the future as possible targets for polyphenol elicitation in strawberry leaves. Kotsuply et al. (2023) also reported higher phenolic acids concentrations in strawberry (*F. x ananassa* cv. Solnechnaya polyanka) plants *in vitro*, and higher quercetin and (+)-catechin content in greenhouse acclimated plants. These authors suggest that reduced stress load favors the accumulation of phenolic acids *in vitro*, and that they are transformed into cell-wall-bound species during greenhouse growth due to lignification and increased stress conditions. Accordingly, all polyphenols quantified *in vitro* in our study were present in much higher concentrations in the insoluble fraction, suggesting that the polyphenols detected in the strawberry leaves consisted mostly of insoluble cell-wall-bound phenolics, with only very few amounts of soluble species.

Finally, we also conducted a morphological characterization of the plants to evaluate the effect of the elicitors in general plant growth and development. *In vitro*, the UVC and the cold treatments induced significantly ($p < 0.05$) longer leaf lengths relative to the untreated control (Table 4); UVC also caused significantly more leaves and buds. *In vivo*, only the length of roots and stems were significantly increased by the elicitors, and only by the exposure to low temperatures (4 °C) or to foliar cysteine (200 mg L⁻¹) (Table 6). However, none of the treatments increased plant biomass relative to their respective controls, *in vivo* or *in vitro*. These results suggest that normal plant growth was not impaired by the treatments in the short term. In a preliminary test, we exposed strawberry plants *in vivo* and *in vitro* to 30 days of UVC, cold and cysteine treatments together, and observed no relevant changes in plant morphology relative to the plants exposed to these treatments only for 15 days (data not shown). However, considering that the economically relevant product is the strawberry fruit, future studies should evaluate the effect of these treatments on crop yield and quality in mature plants.

Table 4. Morphological characterization (mean $\pm$ SD) of strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) *in vitro* plants ($n = 30$, except for control with $n = 10$) after treatment with three elicitors (UV irradiation, cold exposure, and cysteine) for 15 days.

Parameter	Control	UVC (254 nm)	Cold (4° C)	Cysteine (200 mg L ⁻¹)
Length of the longest root (cm)	0.89 $\pm$ 0.93	1.49 $\pm$ 0.90	1.39 $\pm$ 0.48	1.33 $\pm$ 0.81
Length of the longest stem (cm)	2.14 $\pm$ 0.66	2.93 $\pm$ 0.99	2.66 $\pm$ 1.01	2.49 $\pm$ 0.89
Length of the longest leaf (cm)	0.94 $\pm$ 0.25	1.23 $\pm$ 0.26*	1.21 $\pm$ 0.30*	1.10 $\pm$ 0.32
Width of the longest leaf (cm)	0.99 $\pm$ 0.23	1.18 $\pm$ 0.29	1.06 $\pm$ 0.31	1.15 $\pm$ 0.33
Total amount of leaves	19.50 $\pm$ 5.10	38.53 $\pm$ 24.9*	25.93 $\pm$ 9.22	21.30 $\pm$ 4.49
Total amount of buds	3.00 $\pm$ 0.82	5.47 $\pm$ 2.74*	3.87 $\pm$ 1.76	4.47 $\pm$ 1.41
Fresh weight leaves (g)	0.55 $\pm$ 0.28	0.59 $\pm$ 0.42	0.39 $\pm$ 0.37	0.36 $\pm$ 0.24

Differences ($p < 0.05$) in treatments relative to their respective control were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's Test (GraphPad Prism v. 10.1.1, USA), and are marked by asterisks.

Table 5. Morphological characterization (mean $\pm$ SD) of strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) greenhouse-grown seedlings ($n = 6$) after treatment with three elicitors (UV irradiation, cold exposure, and foliar cysteine) for 15 days.

Parameter	Control	UVC (254 nm)	Cold (4° C)	Cysteine (200 mg L ⁻¹)
Length of the longest root (cm)	11.30 $\pm$ 1.47	10.78 $\pm$ 1.63	14.08 $\pm$ 2.66*	13.68 $\pm$ 0.83
Length of the longest stem (cm)	7.28 $\pm$ 0.54	8.96 $\pm$ 1.35	9.52 $\pm$ 0.39*	9.07 $\pm$ 1.15*

Length of the longest leaf (cm)	3.47 ± 0.37	3.20 ± 0.49	3.63 ± 0.16	3.50 ± 0.62
Width of the longest leaf (cm)	3.03 ± 0.20	2.78 ± 0.37	3.20 ± 0.20	2.95 ± 0.36
Total amount of leaves	12.67 ± 3.14	13.50 ± 1.64	14.33 ± 3.50	16.00 ± 4.10
Total amount of buds	4.33 ± 1.21	5.17 ± 0.75	5.33 ± 1.21	5.83 ± 2.04
Fresh weight leaves (g)	1.08 ± 0.21	0.98 ± 0.23	1.37 ± 0.41	1.35 ± 0.39

Differences ($p < 0.05$) in treatments relative to their respective control were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's Test (15 days) (GraphPad Prism v. 10.1.1, USA), and are marked by asterisks.

Due to the small sample size, it was not possible to statistically compare the differences between the elicitor treatments; however, a principal component analysis (PCA) (Figure 1) suggests that gallic acid was the polyphenol most influenced by the elicitor treatments, amongst which the cold treatment had the more weight. Cold tolerance is an intrinsic characteristic of *F. x ananassa*, a perennial plant, which is mostly grown in temperate climate zones, freezing in the winter and re-growing in spring (Koehler et al., 2015). Cold stress has been shown to induce polyphenol synthesis as antioxidants in strawberry fruits and other plants (Koyama et al., 2022). Given that the cold treatment induced large leaf size *in vitro*, which could translate to larger biomass, and considering that tropical highland strawberry crops rarely freeze, future experiments should consider the relevance of stimulating cold-regulated responses in the shikimate pathway for polyphenol accumulation, particularly using *in vitro* plant production systems.

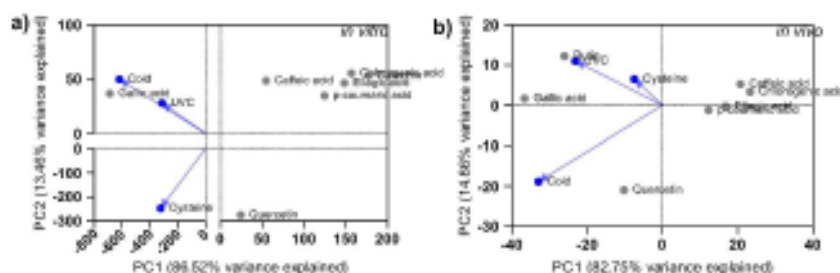


Figure 1. Principal component analysis (PCA) of specific polyphenol content in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaves from plants grown *in vitro* (a) and *in vivo* (b) after treatment with three elicitors (UV irradiation, cold exposure, and foliar cysteine) for 15 days (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

To the best of our knowledge, this is the first report comparing the polyphenol profile of *F. x auracea* cv. Festival leaves in plants grown in a tropical highland environment under three polyphenol-eliciting treatments *in vitro* vs. their counterparts *in vivo*, showing higher amounts and faster accumulation of polyphenols in the *in vitro* regenerated plants. This information should be considered in further experiments using other biotechnological strategies, such as large-scale cultivation in bioreactor systems.

3. Materials and Methods

Reagents and chemicals. Sodium hypochlorite (3%), citric acid (>99% purity) and ascorbic acid (99% purity) were purchased from LABQUIM CR (Alajuela, Costa Rica). Gamba Oxid® (2% hydrogen peroxide, 1% peracetic acid, 2% acetic acid) was purchased from RACKAM S.A. (Alajuela, Costa Rica). Agri-mycin® 16.5 WP (oxytetracycline + streptomycin sulfate) was from Pfizer S.A. (México-Toluca, México). Afungil® 50 WP (benomyl) was from SERACSA (Cartago, Costa Rica). 6-benzylaminopurine (99% purity) and Murashige & Skoog macro- and micronutrient salt bases were obtained from PhytoTech Labs (Lenexa, KS, USA). L-cysteine, Folin & Ciocalteu's phenol reagent and gallic acid,

(+)-catechin, caffeic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, ellagic acid, quercetin, and rutin (all standards >99% purity) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol and ethyl acetate (>99% HPLC-grade) were from Honeywell Riedel-de-HaënTM (Muskegon, MI, USA).

Plant material. Strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) plants were obtained from Fresas de Altura S.A. in Llano Grande, Cartago, Costa Rica (permit R-CM-ITCR-001-2022-OT-CONAGEBIO) and they were kept in a greenhouse at Costa Rica Institute of Technology (Cartago, Costa Rica) with natural temperature (17–25 °C) and light (~12 h daylight) conditions (August to December, 2021), and they were watered daily in the morning and in the afternoon.

In vitro culture. Introduction and multiplication were based on the protocols by Jiménez-Bonilla & Abdelnour-Esquivel (2018). The explants introduced *in vitro* consisted in runners with apical meristems and runners with axillary meristems (approximately 3 cm long). For disinfection, explants ($n = 24$, each) were treated with surgical soap, water, Agri-mycin® + Afungil® and a final step of sodium hypochlorite (treatment A) or Gamba Oxi (treatment B) (Table 6). After disinfection, the explants were rinsed three times with sterile distilled water in aseptic conditions and kept in an antioxidant solution of sterile citric acid (300 mg L⁻¹) and ascorbic acid (300 mg L⁻¹) while they were introduced in cylindrical test tubes containing 10 ml of a complete standard Murashige & Skoog (MS) medium (Murashige & Skoog, 1962) without growth regulators. The pH was adjusted to 5.7 with NaOH 1M. The explants were incubated in a clean room for 8 days at 27°C in darkness, followed by light exposure (with a photoperiod of 16 light hours at 2000 lux and 8 hours in diffuse light) for 4 weeks. Contamination was evaluated every week. The aseptically established plants were subsequently grown in complete MS medium with 6-benzylaminopurine (BAP) in different concentrations (0.5, 1, and 1.5 mg L⁻¹) and subcultivated every 6 weeks.

Table 6. Disinfection protocol of strawberry explants for *in vitro* culture.

Treatment	Disinfectant steps	Working Concentration	Incubation time in agitation (min)
A	Surgical soap	-	10
	Water	-	5
	Agri-mycin® + Afungil®	5 g L ⁻¹ , 4 g L ⁻¹	15
	NaClO	3%	15
B	Surgical soap	-	10
	Water	-	5
	Agri-mycin® + Afungil®	0.8 g L ⁻¹ , 0.8 g L ⁻¹	15
	Gamba Oxi	40%	5

Elicitor treatments. Three elicitor treatments (UV irradiation, cold exposure, and cysteine) were tested in strawberry (*F. x ananassa* cv. Festival) seedlings kept in a greenhouse or *in vitro* plants. For the cold treatment, the plants were incubated at 4°C for 12 hours daily in the dark. The UV treatment consisted of irradiating the plants with 254 nm (UV-C) for 7 minutes each day at the same hour. Finally, 7 ml foliar cysteine (200 mg L⁻¹) was applied daily over the leaves of each seedling, or it was added once to the semisolid medium (*in vitro* plants) at the same concentration. These treatments were established from preliminary tests, based on practicality, local availability, and cost. The seedlings were exposed to each of the three elicitors for 15 days (*in vitro* and *in vitro*) to evaluate their individual effects. However, due to little changes in plant morphology, a second experiment was conducted exposing the plants to all elicitors combined for 30 days (*in vitro*). Morphological features were measured in all plants at the end of the experiments.

Polyphenol extraction. All the leaves from the plants *in vitro* and *in vitro* were freeze-dried and pulverized in a food processor. Insoluble (cell-wall-bound) and soluble (free,

soluble ester- and glycoside-bound polyphenols were extracted using aqueous methanol and ethyl acetate, respectively, as described before (Santiago et al., 2007; Lux et al., 2020). In the *in vitro* plants, due to low biomass, the dried leaves had to be pooled together in three groups of 10 replicates each ($n = 3$), resulting in a single control sample; and the dried material was only solubilized in methanol (10 mg mL^{-1}) before the chromatographic analysis.

Total polyphenol content (TPC). TPC was determined in the water-ethanol extract (*in vitro* plants) or in the methanol-solubilized leaves (*in vitro* plants) by the Folin-Ciocalteu method (Rojas-Garbanzo et al., 2022). TPC was calculated by comparing with an external calibration curve of gallic acid ($10\text{--}80 \text{ mg L}^{-1}$, $r^2 = 0.9863$) (>99% purity, Sigma-Aldrich, USA).

Chromatographic analysis. The methanol-dissolved samples were analyzed in an ultra-high performance liquid chromatography system (UHPLC) with a triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) and a diode-array detector (DAD, Ultimate 3000, TSQ Endura, series TQH-E1-0288, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) as previously reported (Lux et al., 2020; Fratiani et al., 2014). Mass detection of polyphenols was done with an electrospray ionization (ESI) source operating in negative polarity with SRM scan mode with a cycle time of one second. Mass settings were as follows: spray voltage, 2500 V (negative); sheath gas flow, 50 arb; auxiliary gas flow, 10 arb; sweep gas flow, 1 arb; ion transfer tube temperature, 300 °C; vaporizer temperature, 350 °C; and collision induced gas, 1.5 mTorr. Peaks were analyzed with the Chromeleon software (version 7.3, ThermoFisher Scientific) and identified and quantified by UV-Vis wavelengths and mass spectrometry external curves of authentic polyphenol standards (Sigma-Aldrich, USA). At least four samples were analyzed per treatment and each one was injected once for UHPLC-MS/MS-DAD analysis.

Statistical analysis. Normality was tested and differences between the untreated controls and the elicitor treatments were calculated with a two-tailed unpaired *t* test, a one-way analysis of variance (ANOVA), or with a Kruskal-Wallis test, with corresponding post-hoc tests. A principal component analysis (center method; principal components selected based on eigenvalues greater than 1) was conducted to evaluate relationships between elicitor treatments and polyphenol content. All statistical analysis were performed with Graph-Pad Prism (v. 10.1.1., GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Statements and Declarations: The authors declare no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors. Datasets are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: This project was funded by Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica. We thank our students, M. J. Rodríguez-Brenes and N. Vilchez-Mejía for their valuable technical assistance.

Author Contributions: L.A.C.C. and K.S.A. designed the study. K.S.A. and M.F.B.Z. conducted the elicitor experiments *in vivo*. K.S.A., L.S.C. and A.A.E. conducted the elicitor experiments *in vitro*. K.S.A. and A.L.M. conducted the HPLC analysis. L.A.C.C., K.S.A. and F.V.R. wrote the first draft, and all authors read, edited, and approved the final manuscript. F.V.R. is responsible for the final content.

References

1. Afrin S, Gasparrini M, Forbes-Hernandez T.Y., Reboledo-Rodriguez P., Mezzetti B., Varela-López A., Giampieri F. & Battino M. 2016. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J Agric Food Chem.* **64**: 4435–4449.
2. Bhaskar R., Xavier L.S.E., Udayakumaran G., Kumar D.S., Venkatesh R. & Nagella P. 2022. Biotic elicitors: a boon for the *in vitro* production of plant secondary metabolites. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **149**: 7–24.
3. Calvo-Castro L.A., Lobo-Vázquez M., Gómez-González J.C., Amáez-Serrano E., Zamora-Fallas G., Sánchez-Zúñiga K. & Centeno-Cerdas C. 2022. Bioactive potential of tropical highland apple (*Malus domestica* cv. Anna) crude extract: opportunities for food waste revalorization. *Futur J Pharm Sci.* **8**: 57.

4. Cory H., Passarelli S., Sesto J., Tamez M. & Mattei J. 2018. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front Nutr.* 5: 87.
5. Fierascu R.C., Temocico G., Fierascu I., Ortan A. & Babeanu N.E. 2020. *Fragaria* genus: Chemical composition and biological activities. *Molecules.* 25: 498.
6. Fraga C.G., Croft K.D., Kennedy D.O. & Tomás-Barberán F.A. 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 10: 514–528.
7. Fratanni, F., Cardinale, F., Cozzolino, A., Granese, T., Albanese, D., Di Matteo, M., Zaccardelli, M., Coppola, R., Nazzaro, F. 2014. Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chick-pea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *J. Funct. Foods.* 7, 551–557.
8. Garza-Alonso C.A., Olivares-Sáenz E., González-Morales S., Cabrera-De la Fuente M., Juárez-Maldonado A., González-Fuentes J.A., Tortella G., Valdés-Caballero M.V. & Benavides-Mendoza A. 2022. Strawberry Biostimulation: From Mechanisms of Action to Plant Growth and Fruit Quality. *Plants.* 11: 3463.
9. Giampieri F., Forbes-Hernandez T.Y., Gasparrini M., Alvarez-Suarez J.M., Afrin S., Bompadre S., Quiles J.L., Mezzetti B. & Battino M. 2015. Strawberry as a health promoter: An evidence based review. *Food Funct.* 6: 1386–1398.
10. Gündüz K. 2015. Strawberry: Phytochemical Composition of Strawberry (*Fragaria × ananassa*). Elsevier Inc., 733–752 pp.
11. Gurz A., Dwivedi P., Kaur P. & Pandey D.K. 2022. Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under in vitro condition. *South African Journal of Botany.* 149: 1029–1043.
12. Halder M., Sarkar S. & Jha S. 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci.* 19: 880–895.
13. Hano C. & Tungmunthum D. 2020. Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. *Medicines.* 7: 26.
14. Jiménez-Bonilla, V., & Abdelnour-Esquivel, A. 2018. Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium coccineum*). *Revista Tecnología En Marcha.* 31: 144–159
15. Khan A.K., Kousar S., Tungmunthum D., Hano C., Abbasi B.H. & Anjum S. 2021. Nano-elicitation as an effective and emerging strategy for in vitro production of industrially important flavonoids. *Applied Sciences (Switzerland).* 11: 1694.
16. Koehler G., Rohloff J., Wilson R.C., Kopka J., Erban A., Winge P., Bones A.M., Davik J., Alsheikh M.K. & Randall S.K. 2015. Integrative “omic” analysis reveals distinctive cold responses in leaves and roots of strawberry, *fragaria × ananassa* ‘Korona.’ *Front Plant Sci.* 6: 1–21.
17. Kotusupiy O., Karpova E., Trofimova E., Novikova T. & Ambros E. 2023. Transformation of Strawberry Plants’ Phenolic Profile after Treatment with a Mechanocomposite Based on Silicon Chelates in the Course of Development under In Vitro, Ex Vitro, and In Vivo Conditions. *Horticulturae.* 9: .
18. Koyama R., Ishibashi M., Fukuda I., Okino A., Osawa R. & Uno Y. 2022. Pre- and Post-Harvest Conditions Affect Polyphenol Content in Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plants.* 11: .
19. Li H., Tsao R. & Deng Z. 2012. Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Canadian Journal of Plant Science.* 92: 1101–1111.
20. Lux P.E., Freiling M., Stuetz W., Von Tucher S., Carle R., Steingass C.B. & Frank J. 2020. (Poly)phenols, Carotenoids, and Tocochromanols in Corn (*Zea mays* L.) Kernels As Affected by Phosphate Fertilization and Sowing Time. *J Agric Food Chem.* 68: 612–622.
21. M. Al Khayri J. & M. Naik P. 2016. Impact of Abiotic Elicitors on In vitro Production of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Journal of Advanced Research in Biotechnology.* 1: 1–7.
22. Marchev A.S., Yordanova Z.P. & Georgiev M.I. 2020. Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol.* 40: 443–458.
23. Matkowski A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnol Adv.* 26: 548–560.
24. Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 474–497.
25. Qin Z., Liu H.M., Ma Y.X. & Wang X. De 2021. Developments in extraction, purification, and structural elucidation of proanthocyanidins (2000–2019). Elsevier B.V., 347–391 pp.
26. Rasouli H., Farzadi M.H. & Khodarahmi R. 2017. Polyphenols and their benefits: A review. *Int J Food Prop.* 20: 1700–1741.
27. Rojas-Garbanzo, C., Pérez, A. M., Vaillant, F., Pineda-Castro, M. L. 2016. Physicochemical and Antioxidant Composition of Fresh Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) Fruits in Costa Rica. *Brazilian Journal of Food Technology.* 19, e2015097.
28. Salas-Arias K., Irias-Mata A., Sánchez-Kopper A., Hernández-Moncada R., Salas-Morgan B., Villalta-Romero F. & Calvo-Castro L.A. 2023. Strawberry *Fragaria × ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts. *Molecules.* 28: 1865.
29. Salas-Arias K.M., Salas-Morgan B. & Calvo-Castro L.A. 2022. Potencial bioactivo de los residuos del cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa*) en Costa Rica. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales.* 9: 55–68.
30. Santiago R., Reid L.M., Armason J.T., Zhu X.Y., Martinez N. & Malvar R.A. 2007. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to *Gibberella* stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). *J Agric Food Chem.* 55: 5186–5193.

31. Severo J., de Oliveira L.R., Bott R., Le Bourvellec C., Renard C.M.G.C., Page D., Chaves F.C. & Rombaldi C.V. 2017. Preharvest UV-C radiation impacts strawberry metabolite content and volatile organic compound production. *Lwt.* 85: 390–393.
32. Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M. & Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules.* 24: 2452.
33. Villamil-Galindo, E., Van, de V. F. & Piagentini, A. M. 2020. Extracts from strawberry by-products rich in phenolic compounds reduce the activity of apple polyphenol oxidase. *LWT - Food Science and Technology*, 133, 110097.
34. Villamil-Galindo, E., Van, de V. F. & Piagentini, A. M. 2021. Strawberry agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds: effect of cultivar on the phenolic profile and the antioxidant capacity. *Bioresources and Bioprocessing*, 8: 61.
35. Wilson S.A. & Roberts S.C. 2012. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J.* 10: 249–268.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo 6. Artículo 4 (publicado)

226 |  Tecnología en Marcha. Vol. 37, especial. Noviembre, 2024
30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología

Incorporating strawberry leaf extract from waste biomass in prototype topical gel and cream formulations

Incorporación de extracto de hoja de fresa
procedente de biomasa residual en prototipos
de formulaciones tópicas de gel y crema

Karla Salas-Arias¹, Fabián Villalta-Romero², Randall Chacón-
Cerdas³, David Hidalgo-Paniagua⁴, Laura A. Calvo-Castro⁵

Salas-Arias, K; Villalta-Romero, F; Chacón-Cerdas, R; Hidalgo-Paniagua, D; Calvo-Castro, L.A. incorporating strawberry leaf extract from waste biomass in prototype topical gel and cream formulations. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 226-233.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9>

- 1 Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Universidad Nacional (UNA), Universidad Estatal a Distancia (UNED), Costa Rica.
ksalas@itcr.ac.cr
<https://orcid.org/0000-0002-8772-1693>
- 2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
fvillalta@itcr.ac.cr
<https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>
- 3 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
rchacon@itcr.ac.cr
<https://orcid.org/0000-0002-5384-4849>
- 4 Samira Dreams S.R.L. Costa Rica.
info@samiradreams.com
- 5 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
acalvo@itcr.ac.cr
<https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

Keywords

Leaves; natural extracts; polyphenols; strawberry.

Abstract

Berry fruits are an important source of polyphenols with beneficial antioxidant properties for human health. However, higher bioactive phytochemical content has been reported in berry leaves, which are usually discarded or underutilized. In this study, a hydroalcoholic extract with relevant polyphenol content obtained from strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* cv. Festival), an agro-industrial waste material, was incorporated in two commercial topical formulations (aqueous gel and oil/water cream), in three concentrations of active ingredient (0.02, 0.1 and 1% strawberry leaf extract). The physicochemical properties of the formulations were monitored for 45 days at different temperatures. Particle size and stability analysis showed that the cream-based formulations were the most optimal for the development of a topical prototype with potential bioactive activities.

Palabras clave

Extractos naturales; hojas; polifenoles; fresa.

Resumen

Las bayas son una fuente importante de polifenoles con propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana. Sin embargo, se ha reportado mayor contenido de fitoquímicos bioactivos en las hojas, las cuales generalmente se desechan o se subutilizan. En este estudio, se incorporó un extracto hidroalcohólico con contenido relevante de polifenoles obtenido de hojas de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Festival), material de desecho agroindustrial, en dos formulaciones tópicas comerciales (gel acuoso y crema aceite/agua), en tres concentraciones de ingrediente activo (0.02, 0.1 y 1% extracto de hoja de fresa). Las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones se monitorearon durante 45 días a diferentes temperaturas. El análisis de estabilidad y tamaño de partícula mostró que las formulaciones a base de crema fueron las óptimas para el desarrollo de un prototipo tópico con potenciales actividades bioactivas.

Introduction

Strawberry leaves have been identified as a potential source of apparently abundant biomass with relevant bioactive components, particularly antioxidant polyphenols [1], [2], [3], [4]. Previous studies have reported possible antioxidant, photoprotective, and anti-aging activities in cosmetic and pharmaceutical topical products containing strawberry components [5], [6], [7], [8], [9].

Bioactive phytochemicals could replace some of the environmentally contaminant chemicals in cosmetics, while potentially providing added health benefits, particularly in skin-care products. Moreover, such bioactive phytochemicals are available in industrial and agricultural waste, which are often unexploited and could be incorporated into environmentally friendlier product design.

The purpose of this study was to evaluate the physicochemical properties and general stability of gel and cream prototype formulations containing a strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf extract (SLE) rich in polyphenols [1]. A similar gel formulation developed by Auliya *et al.*

[10] containing 1% strawberry leaf extract showed an SPF barrier protection efficacy of 69.94 ± 0.280 . Meanwhile, Silva *et al.* [11] proposed that industrial-scale production of a gel-cream with 17.5% strawberry leaf extract could gain relevant profitability in the short term.

Methodology

Aqueous gel (water, carbopol, *Aloe barbadensis* extract, glycerin, sodium hydroxide 0.001%, and phenoxyethanol) and oil-in-water cream (water, glyceryl stearate, ceteareth-20, ceteareth-12, cetearyl alcohol, cetyl palmitate, sodium polyacrylate, *Aloe barbadensis* extract, glycerin, and phenoxyethanol) base formulations were provided by Samira Dreams S.R.L. (Costa Rica). The hydroalcoholic strawberry leaf extract (SLE) was prepared from strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* cv. Festival; Llano Grande, Oatago, Costa Rica; permit R-OM-ITOR-001-2022-OT-CONAGEBIO) as reported before [1].

SLE contained 108.83 ± 4.65 mg gallic acid equivalents g^{-1} dry weight (DW) total polyphenols; 10.25 ± 0.60 mg quercetin equivalents g^{-1} DW total flavonoids; 67.63 ± 38.84 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW gallic acid; 3.62 ± 4.97 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW caffeic acid; 3.70 ± 2.68 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW p-coumaric acid; 7.14 ± 3.40 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW rutin; 21.90 ± 39.72 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW ellagic acid; 19.44 ± 3.98 $\mu\text{g mg}^{-1}$ DW quercetin; and 2918 ± 281 $\mu\text{mol trolox equivalents g}^{-1}$ DW oxygen radical absorbance capacity (ORAC) as reported before [1]. SLE was added to gel and cream in three concentrations (0.02, 0.1 and 1%) in triplicates, and they were monitored macroscopically for 45 days at 4 °C, room temperature (~ 25 °C), or 37 °C.

Rheology measurements were performed at 23–24 °C in a rotational rheometer (Äres G2, WatersTM, Germany) at Centro de Investigación en Ciencias e Ingeniería de Materiales (CICIMA, Universidad de Costa Rica). The pH was measured in reflection photometer (Quantofix ® Relax, Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany). The hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and ζ -potential of the particles from cream and gel samples dissolved in water (10 mg mL^{-1}) were measured in a Zetasizer Nano (Nano ZS, Malvern-Panalytical, UK) at Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (OEQUIATEO, Instituto Tecnológico de Costa Rica) as reported before [12]. Total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method as described previously [1].

Microbial content was determined in a random sample by standard methods (PT-MIO-35 Petrifilm, AOAC 997.02; PT-MIO-37 Petrifilm; PT-MIO-27 Petrifilm, AOAC 991.14, AOAC 998.08; and *Bacillus* sp. selective medium) at OEQUIATEO.

Results and discussion

In this study, topical gel and cream formulations were supplemented with 0.02, 0.1 and 1% strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf extract (SLE), and their general physicochemical properties and stability were evaluated in freshly prepared samples and after 45 days in different temperatures [13].

Immediately after preparation, the gel and cream topical formulations with 0.02, 0.1 and 1% strawberry leaf extract (SLE) were centrifuged at 3000 rpm for 30 min at room temperature, showing no observable changes (no precipitates, no phase separation). No contaminating microorganisms (filamentous fungi and yeast, *Staphylococcus aureus*, faecal coliforms, *Escherichia coli* and *Bacillus* sp.) were detected in a random sample of the formulations.

The gel formulation showed lower apparent viscosity (presented on $\log_{10}$ for better appreciation) compared to the cream system (Figure 1). In general, for both systems, a reduction in the apparent viscosity with the increase of the shear rate can be observed. This is characteristic of a non-

Newtonian behaviour and indicates that these systems have sheared thinning characteristics. Additionally, the apparent viscosity decreased with the increase of the strawberry leaf extract concentration in both systems (Figure 1). This viscosity reduction behaviour has been reported before [14], and it is probably due to the reduction of the capacity of water-binding with the polymer/micelles in the system caused by the addition of the strawberry leaf concentrate, consequently reducing the regeneration of more complex structures.

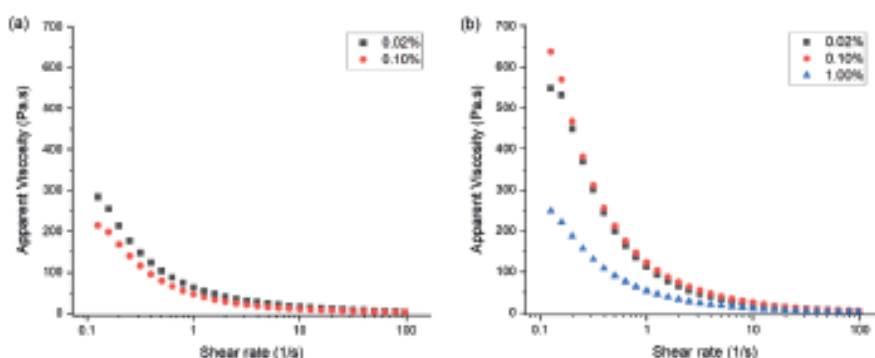


Figure 1. Apparent viscosity versus shear rate ($\log_{10}$) on (a) gel and (b) cream formulate samples with different strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) concentrations.

Particle size, polydispersity index and ζ -potential may help predict the transport of the formulations through biological membranes [12]. Smaller particles usually improve particle/skin adhesion and absorption [16]. Liu *et al.* [18] report that particles larger than 600 nm are not able to penetrate to deeper skin layers, while particles of less than 600 nm can achieve higher skin deposition. However, Xiang *et al.* [17] suggest that higher precipitation of larger particles could increase topical permeation. The degree of penetration also depends on surface charge; however, there is no consensus on which type of charge produces better skin absorption [16]. The routes of skin permeation must also be considered, from more superficial passive skin penetration to deeper infiltration through the hair follicles [17]. Particle size in our formulations was between 460 to 776 nm, with no significant size difference between formulations, except for the 0.02% SLE cream, which had significantly larger particles than the rest (Table 1).

The type of gel/cream formulation significantly influenced the particle size, their size homogeneity (polydispersion), and the surface charge (Table 1). These variations in the properties of formulations are induced by the interaction of active ingredients and its excipients [18]. Particle size in the gel formulations was inversely proportional to the incremental addition of SLE, showing smaller and more homogeneous size distribution, but exhibiting at the same time a decrease in their surface charge with higher SLE concentrations. This suggests that gel formulations with more SLE may precipitate easier when applied (sample < -80mV) [18], [20]. The opposite effect occurred in the cream formulations (Table 1), where the incremental SLE concentrations increased particle size and polydispersity index, while becoming more stable in solution due to more negative charges and are therefore less likely to precipitate. Particles with more negative surface charges tend to react more spontaneously and consistently with oppositely charged biomolecules, such as amino groups in proteins at acidic pH and polycations [21]. Conversely, considering interactions with negatively charged biological membranes, it is possible that

negatively charged particles will not be able to interact or enter easily through the cell membrane by passive transport, and other transport mechanisms will be required to internalize them [22], [28], [24].

Table 1. Particle size, polydispersity index (PDI), and ζ -potential from gel and cream formulations with different strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) concentrations.

Formulation	SLE (%)	Size (nm)	PDI	ζ -Potential
Gel	0.02	2426.33 $\pm$ 494.95 ^a	1.00 $\pm$ 0.00 ^a	-49.27 $\pm$ 3.96 ^a
	0.1	775.8 $\pm$ 230.55 ^b	0.74 $\pm$ 0.07 ^b	-48.07 $\pm$ 1.91 ^b
	1	580.87 $\pm$ 60.41 ^b	0.47 $\pm$ 0.04 ^b	-27.30 $\pm$ 6.09 ^a
Cream	0.02	449.13 $\pm$ 75.72 ^b	0.65 $\pm$ 0.04 ^b	-53.20 $\pm$ 1.51 ^b
	0.1	683.70 $\pm$ 46.94 ^b	0.61 $\pm$ 0.08 ^b	-53.50 $\pm$ 2.71 ^b
	1	746.9 $\pm$ 49.29 ^b	0.73 $\pm$ 0.07 ^b	-58.10 $\pm$ 2.95 ^a

Statistical differences between gel vs. cream formulations within each concentration were determined by a General Linear Model and Tukey's multiple comparison test, and they are indicated by superscript letters ($p < 0.05$). Equal variances were determined by Levene's test ($p > 0.05$) (Minitab v.19.1.1., USA).

In terms of appearance, the 1% SLE formulations experienced observable loss of consistency and intense browning after 45 days at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$), while the 0.02% and 0.1% formulations remained stable to the touch, with no detectable changes in odour, and with only mild browning relative to the original yellow-like coloration (Figure 2). However, in the samples kept at 37°C , both gel and cream formulations showed intense browning and extreme dehydration, to the point that only dry flakes remained of the 0.02% and 0.1% gel (Figure 2). Thus, our SLE-containing gel and cream formulations should be stored in opaque airtight containers, and the preservative component of the formulations should be improved to prevent further oxidation.

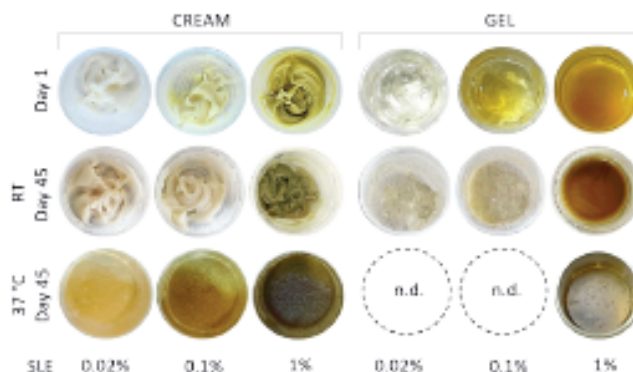


Figure 2. Colour changes in gel and cream topical formulations containing strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE, percentage active ingredient) after 45 days at room temperature (RT, $\sim 25^\circ\text{C}$) or at 37°C in a translucent container. Gel samples at 37°C that were completely dry and crystallized after 45 days are reported as "not detected" (n.d.).

The increasing SLE concentrations did not seem to relevantly affect the pH values of the gel and cream formulations (Table 2); however, a larger sample size is required to statistically confirm this observation. On the other hand, the total average pH of all formulations was significantly ($p < 0.05$, unpaired t test; GraphPad Prism v. 10.1.1., USA) more acidic after 45 days incubation (6.43 ± 0.90 , mean $\pm$ SD) relative to the average pH values observed immediately after gel/cream preparation (6.35 ± 0.68 , mean $\pm$ SD). Nonetheless, all formulations remained close to the recommended range of pH from 4 to 6 for optimal topical applications [26] and, if anything, more acidification could eventually be necessary, particularly in the cream formulations.

The SLE used in this study was previously reported to contain 108.83 ± 4.65 total polyphenols (mg gallic acid equivalents g^{-1} dry weight) and 2918 ± 281 oxygen radical absorbance capacity (ORAO, μ mol trolox equivalents g^{-1} dry weight) [1]. The addition of SLE did not relevantly increase the total polyphenol content (TPC) of the gel and cream formulations (~ 200 mg GAE g^{-1} DW), and TPC was reduced after 45 days both at 4 °C and 37 °C, although SLE seems to have aided in maintaining higher TPC values over time (Table 3). However, as mentioned before, a larger sample size is required to statistically confirm this observation. Nonetheless, as active ingredient, the SLE concentrations used in this study might not be sufficient to provide added antioxidant properties *in vivo*, which must be tested in future experiments.

Table 2. pH measurements (mean $\pm$ SD) of gel and cream formulations (10 mg mL⁻¹) containing strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) after 45 days at different temperatures.

Formulation	SLE (%)	Day 1	Day 45		
			4 °C	25 °C	37 °C
Gel	0	6.43 $\pm$ 0.25	n.d.	5.53 $\pm$ 0.23	n.d.
	0.02	6.0 $\pm$ 0.44	4.75 $\pm$ 0.07	4.97 $\pm$ 0.59	5.15 $\pm$ 0.21
	0.1	5.67 $\pm$ 0.57	4.70 $\pm$ 0.14	5.00 $\pm$ 1.04	5.05 $\pm$ 0.35
	1	5.70 $\pm$ 0.26	4.80 $\pm$ 0.14	5.00 $\pm$ 0.56	4.85 $\pm$ 0.35
Cream	0	6.13 $\pm$ 0.81	n.d.	6.60 $\pm$ 0.72	n.d.
	0.02	6.83 $\pm$ 0.49	4.70 $\pm$ 0.28	5.80 $\pm$ 0.53	4.75 $\pm$ 0.07
	0.1	7.27 $\pm$ 0.42	6.96 $\pm$ 2.19	7.50 $\pm$ 0.26	5.70 $\pm$ 0.28
	1	6.80 $\pm$ 0.44	4.50 $\pm$ 0.00	7.13 $\pm$ 1.69	5.20 $\pm$ 0.28

$n = 3$, except samples at 4 and 37 °C with $n = 2$. n.d.: not determined.

Table 3. Total polyphenol concentrations (mean $\pm$ SD; mg GAE g^{-1} DW) of gel and cream formulations (10 mg mL⁻¹) containing strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) leaf extract (SLE; percentage active ingredient) after 45 days at different temperatures.

Formulation	SLE (%)	Day 1	Day 45	
			4 °C	37 °C
Gel	0	244.17 $\pm$ 5.97	-	-
	0.02	241.83 $\pm$ 16.30	72.15 $\pm$ 4.27	78.19 $\pm$ 28.95
	0.1	240.67 $\pm$ 8.78	80.87 $\pm$ 19.46	110.40 $\pm$ 4.27
	1	261.50 $\pm$ 21.75	120.13 $\pm$ 4.75	170.81 $\pm$ 86.37
Cream	0	217	-	-
	0.02	215.17 $\pm$ 1.15	100.50 $\pm$ 20.64	40.60 $\pm$ 1.90
	0.1	231.17 $\pm$ 4.04	140.44 $\pm$ 64.30	15.60 $\pm$ 4.51
	1	243.75 $\pm$ 13.08	257.05 $\pm$ 270.05	163.53 $\pm$ 82.34

GAE, gallic acid equivalents; DW, dry weight. $n = 3$ for day 1 (except 0% SLE cream), $n = 2$ for day 45.

Conclusions

Supplementation of gel and cream topical formulations with 0.02 to 1% strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) leaf extract (SLE) rich in polyphenols resulted in physically stable formulations, but only the cream formulations retained its general characteristics over 45 days, showing also more favorable particle behavior, and are better suited for continuing the development of a topical product with SLE.

Acknowledgments

This work was funded by Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITOR), project "Formulation of a topical prototype using strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Festival) extracts rich in anthocyanins". The authors thank R. Starbird-Pérez (School of Chemistry, ITORE), and K. Rodríguez and M. Montero (OIOIMA, UOR) for their help with the viscosity measurements.

Author contributions

K.S.A., D.H.P., F.V.R. and R.O.O. conducted the experiments. L.A.O.O. and F.V.R. wrote the first draft, and all authors approved the final manuscript. F.V.R. is responsible for the final content.

Declarations

D.H.P. from Samira Dreams S.R.L. provided the base gel and cream formulations. The authors declare no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects. Datasets are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- [1] K. Salas-Arias *et al.*, "Strawberry *Fragaria x ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts," *Molecules*, vol. 28, no. 4, p. 1865, 2023, doi: 10.3390/molecules28041865.
- [2] I. Fecka, K. Bednarska, and M. Włodarczyk, "Fragaria x ananassa cv. Senga Sengana Leaf: An Agricultural Waste with Antiglycation Potential and High Content of Ellagitannins, Flavonols, and 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic Acid," *Molecules*, vol. 27, no. 16, p. 5293, 2022, doi: 10.3390/molecules27165293.
- [3] A. Kårlund, K. Hanhineva, M. Lehtonen, G. J. McDougall, D. Stewart, and R. O. Karjalainen, "Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds," *J Sci Food Agric*, vol. 97, no. 7, pp. 2182–2190, May 2017, doi: 10.1002/USFA.8027.
- [4] L. P. Stanojević, M. Z. Stanković, D. J. Cvetković, M. D. Cakić, S. R. Savić, and M. D. Mijaković, "Antioxidant activity of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) leaves," *Sep Sci Technol*, vol. 52, no. 6, pp. 1039–1051, 2017, doi: 10.1080/01496395.2017.1281305.
- [5] S. Afrin, T. Y. Forbes-Hernandez, F. Giampieri, M. Battino, and M. Gasparini, "The photoprotective effects of strawberry-based cosmetic formulations on human dermal fibroblasts," *Acta Horti*, vol. 1156, pp. 397–404, 2017, doi: 10.17660/ActaHorti.2017.1156.59.
- [6] M. Gasparini *et al.*, "A Pilot Study of the Photoprotective Effects of Strawberry-Based Cosmetic Formulations on Human Dermal Fibroblasts," *Int J Mol Sci*, vol. 16, pp. 17870–17884, 2015, doi: 10.3390/ijms160817870.
- [7] M. Gasparini *et al.*, "Strawberry-Based Cosmetic Formulations Protect Human Dermal Fibroblasts against UVA-Induced Damage," *Nutrients*, vol. 9, no. 6, p. 606, Jun. 2017, doi: 10.3390/nu9060606.
- [8] A. Markiewicz, M. Zasada, A. Erkiert-Polguj, M. Wleckowska-Szakiel, and E. Budzisz, "An evaluation of the anti-aging properties of strawberry hydrolysate treatment enriched with L-ascorbic acid applied with microneedle mesotherapy," *J Cosmet Dermatol*, vol. 18, no. 1, pp. 129–135, 2019, doi: 10.1111/jocd.12545.

- [9] A. Ziemińska, Z. Nizioł-Lukaszewska, M. Zagórska-Dziok, T. Bujak, M. Wójcik, and I. Sowa, "Evaluation of cosmetic and dermatological properties of kombucha-fermented berry leaf extracts considered to be by-products," *Molecules*, vol. 27, p. 2345, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27072345>.
- [10] D. F. Auliya, Suhartinah, and H. M. Ansory, "Potency and Stability Emulgel of Ethanol Extract Strawberry Leaf (*Fragaria x ananassa* var. Duchesne) as a Sunscreen," *Jurnal Majalah Farmaseutik*, vol. 18, no. 4, p. 469, 2022, doi: [10.22146/farmaseutik.v18i4.73909](https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v18i4.73909).
- [11] A. P. Silva, B. Rodrigues, L. Bonny, and Y. Manrique, "Strawberry Leaves Extract for Cosmetic Industry," *U.Porto Journal of Engineering*, vol. 8, no. 5, pp. 135–144, 2022, doi: [10.24840/2183-6493_008.005_0012](https://doi.org/10.24840/2183-6493_008.005_0012).
- [12] L. A. Calvo-Castro *et al.*, "Self-Emulsifying Micellization of Crude Extracts from Apple (*Malus domestica* cv. Anna), Plum (*Prunus domestica* cv. Satsuma), and Guava (*Psidium guajava* L.) Fruits," *Molecules*, vol. 28, no. 3, p. 1297, Feb. 2023, doi: [10.3390/molecules28031297](https://doi.org/10.3390/molecules28031297).
- [13] National Health Surveillance Agency, *Cosmetic Products Stability Guide/National Health Surveillance*. Brasília: ANVISA, 2005. Consultado: Feb. 01, 2024. [Online]: www.anvisa.gov.br
- [14] H. Jaster, G. D. Arend, K. Rezzadori, V. C. Chaves, F. H. Reginatto, and J. C. C. Petrus, "Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration," *Food Research International*, vol. 104, no. July 2017, pp. 119–125, 2018, doi: [10.1016/j.foodres.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.006).
- [15] M. Elmowafy, "Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 203, p. 111748, Jul. 2021, doi: [10.1016/j.colsurfb.2021.111748](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111748).
- [16] M. Liu, M. Sharma, G. L. Lu, Z. Zhang, N. Yin, and J. Wen, "Full factorial design, physicochemical characterization, ex vivo investigation, and biological assessment of glutathione-loaded solid lipid nanoparticles for topical application," *Int J Pharm*, vol. 630, p. 122381, Jan. 2023, doi: [10.1016/j.ijpharm.2022.122381](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122381).
- [17] H. Xiang, S. Xu, W. Zhang, Y. Li, Y. Zhou, and X. Miao, "Skin permeation of curcumin nanocrystals: Effect of particle size, delivery vehicles, and permeation enhancer," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 224, p. 113203, Apr. 2023, doi: [10.1016/j.colsurfb.2023.113203](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113203).
- [18] A. Ali *et al.*, "Relationship between sensorial and physical characteristics of topical creams: A comparative study on effects of excipients," *Int J Pharm*, vol. 613, p. 121370, Feb. 2022, doi: [10.1016/j.ijpharm.2021.121370](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121370).
- [19] D. F. Evans and H. Wennerström, *The Colloidal Domain – where physics, chemistry, biology and technology meet*, 2nd Edition. Wiley-VCH, USA, 1999. doi: [10.1515/arih-2001-0032](https://doi.org/10.1515/arih-2001-0032).
- [20] R. Pool and P. G. Bolhuis, "The influence of micelle formation on the stability of colloid surfactant mixtures," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 44, pp. 14789–14797, Nov. 2010, doi: [10.1039/c0cp00912a](https://doi.org/10.1039/c0cp00912a).
- [21] V. Francia, D. Montizaan, and A. Salvati, "Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine," *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 11, pp. 338–353, Feb. 2020, doi: [10.3762/bjnano.11.25](https://doi.org/10.3762/bjnano.11.25).
- [22] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, and C. Yin, "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and bio-distribution of polymeric nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3657–3666, May 2010, doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.01.065](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065).
- [23] A. Vedadghavami, C. Zhang, and A. G. Bajpayee, "Overcoming negatively charged tissue barriers: Drug delivery using cationic peptides and proteins," *Nano Today*, vol. 34, Oct. 2020, doi: [10.1016/j.nantod.2020.100898](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100898).
- [24] Y. Ikeda, H. Nakamura, S. Ohsaki, and S. Watano, "Direct translocation of a negatively charged nanoparticle across a negatively charged model cell membrane," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 23, no. 17, pp. 10591–10599, May 2021, doi: [10.1039/d0cp06278b](https://doi.org/10.1039/d0cp06278b).
- [25] M. Lukić, I. Pantelić, and S. D. Savić, "Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products," *Cosmetics*, vol. 8, no. 69, Aug. 2021, doi: [10.3390/cosmetics8030069](https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069).

Anexo 7. Divulgación.



Acta de avance o anteproyecto de Investigación

Énfasis: *Sistemas de producción agrícolas*

Estudiante: *Karla Melissa Salas Arias*

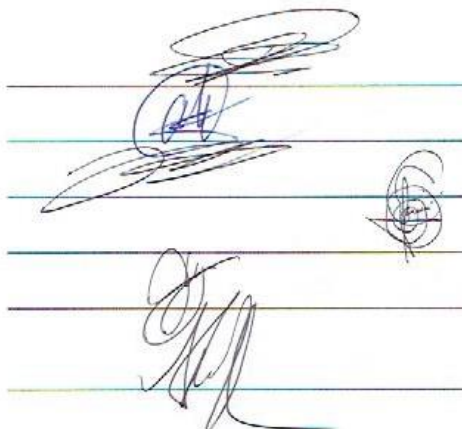
Correo: *ksalas@itcr.ac.cr*

Estudiante del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo

A las 13:00 horas del 30 de enero del 2020, se presenta en el Instituto Tecnológico de Costa Rica en el Campus Tecnológico Local San Carlos, el aspirante de referencia, ante un tribunal del programa de Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo, con el propósito de realizar la evaluación del avance o anteproyecto de su investigación de tesis doctoral.

Tribunal Evaluador:

1. Dr. Rafael Orozco Rodríguez
2. Dra. Citlalli Colín Chávez
3. Dr. Fabián Echeverría Beirute
4. Dr. Guillermo Penieres Carrillo
5. Dr. Oscar Mascorro Gallardo
6. Dr. Andrés Sánchez Kopper
(Tutor)
7. Otro:





Otorga el presente Reconocimiento a:

Karla Melisa Salas Arias

Por su participación con la ponencia:

**Caracterización fitoquímica de compuestos bioactivos en extractos etanólicos de hoja de fresa
(*Fragaria x ananassa* var. Festival)**

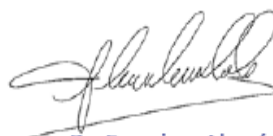
En el panel de ponencias 54 del eje: Desarrollo y seguridad alimentaria y nutricional. Que se llevó a cabo el 26 de noviembre de 2021, con una duración de 1 hora y 30 minutos, en la modalidad a distancia.



MSc. Dayra Blandón
Presidenta, CSUCA-SIRCIP



Dr. Armando Euceda
Coordinador General



Dr. Francisco Alarcón
Director Académico y
Secretario General Adjunto, CSUCA



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS





TEC | Tecnológico
de Costa Rica



DOCINADE
Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo

Otorga el certificado al estudiante
Karla Melissa Salas Arias

Por su participación en el

XXVI Seminario Internacional en Ciencias Naturales para el Desarrollo, celebrado bajo modalidad virtual sincrónica, con una duración de 24 horas, 01 de febrero al 04 de febrero del 2021.

Giovanni Sáenz-Arce

Digitally signed by
Giovanni Sáenz-Arce
Date: 2021.02.19
21:11:08 -06'00'

Dr. Giovanni Sáenz Arce
Coordinador DOCINADE-UNA
Coordinador General DOCINADE



Firmado digitalmente por
TOMÁS DE JESÚS GUZMÁN
HERNÁNDEZ (FIRMA)
Fecha: 2021.02.23 14:30:17
-06'00'

Dr. Tomás Guzmán Hernández
Coordinador DOCINADE-TEC

JUAN
FRANCISCO
MORALES
QUIROS (FIRMA)

Firmado digitalmente por JUAN
FRANCISCO MORALES QUIROS (FIRMA)
Nombre de reconocimiento (CN):
juanfrancisco.moraless@uned.ac.cr
juanfrancisco.moraless@uned.ac.cr
FRANCISCO SÁENZ-AARCE (PERSONA FÍSICA)
FRANCISCO SÁENZ-AARCE (PERSONA FÍSICA)
MORALES QUIROS (FIRMA)
Fecha: 2021.02.23 14:30:17 -06'00'

Dr. Juan Francisco Morales Quirós
Coordinador DOCINADE-UNED

DOCINADE

Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo

Otorga el certificado a

Por su participación en el

XXVII Seminario Internacional en Ciencias Naturales para el Desarrollo,
celebrado bajo modalidad virtual sincrónica,
31 de enero al 04 de febrero 2022.



Dr. Cristian Moreira Segura
Representante DOCINADE-TEC

Dr. Giovanni Sáenz Arce
Representante DOCINADE-UNA
Coordinador General DOCINADE

Dr. David Valverde Barquero
Representante DOCINADE-UNED



Ibagué, 1 de junio de 2022

A quien corresponda:

Por medio de la presente, informo que la profesora *Karla Melisa Salas Arias*, del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), del Tecnológico de Costa Rica, participó en el “II Seminario Internacional de Ciencia y Tecnología Agroindustrial”, realizado por la Universidad del Tolima y la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroindustrial. El seminario se llevó a cabo de manera virtual el día 27 de mayo de 2022 y tuvo una duración de 8 horas.

Cordialmente,



Ivonne Ximena Cerón Salazar, Ph.D
Coordinadora
Maestría en Ciencia y Tecnología Agroindustrial
Facultad de Ingeniería Agronómica
Universidad del Tolima
Correo: mca@ut.edu.co
Ibagué - Colombia