



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la vida útil de un extracto obtenido de la cáscara de piña (*Ananas comosus*) con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Erika Fernanda Nuñez Ambato

Tutor: MSc. Dánae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Febrero – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Lic. MSc. Dánae Fernández Rivero

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero de 2024

.....

MSc. Dánae Fernández Rivero

C.I 175781209

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Erika Fernanda Nuñez Ambato, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Erika Fernanda Nuñez Ambato

C.I. 1805445754

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Erika Fernanda Nuñez Ambato

C.I. 1805445754

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

.....

Presidente del Tribunal

.....

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

1309651998

.....

Mg. María Eugenia García Pazmiño

2100248505

Ambato, 07 de febrero de 2024

DEDICATORIA

*A mi mamá, mi inspiración constante y
el ejemplo de fortaleza que guía mis pasos;
a mi mami Luli cuyo amor incondicional y cuidado
han forjado la persona que soy hoy; a mi hermano,
apoyo irremplazable y a mis tíos, cuyas enseñanzas
y amor han iluminado mi camino.*

*Gracias a todos ustedes, soy quien soy
y estoy eternamente agradecida. Los amo profundamente.*

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser parte integral de mi éxito, por haberme dado la fuerza y la determinación para perseguir mis sueños.

A mi familia, mi mayor apoyo y fuente inagotable de amor, sin ustedes nada sería posible. Gracias por estar siempre ahí, por sus consejos sabios, risas contagiosas y abrazos reconfortantes. Los amo infinitamente.

A Natasha y Sarita, mis mejores amigas, por su apoyo incondicional y por nunca dejarme sola. Mi amor por ustedes es tan grande como la vida misma.

A ese grupito de personas con las que tuve de la oportunidad de convivir más mis últimos semestres, hicieron que cada día sea una aventura. Nunca cambien ese corazón tan bonito que tienen.

A mi tutora, por ser mucho más que una guía académica; su positividad y apoyo incondicional fueron fundamentales para completar esta etapa de mi vida. Gracias por ser más que una mentora, una fuente constante de inspiración.

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por ser los medios que me permitieron cumplir mis sueños.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Justificación.....	1
1.1.2. Principales características de la piña (<i>Ananas comosus</i>)	2
1.1.3. Compuestos bioactivos de plantas	4
1.1.4. Principales compuestos bioactivos de la cáscara de piña.....	4
1.1.5. Extracción de compuestos bioactivos	6
1.1.6. Antioxidantes	7
1.1.6.1. Estrés oxidativo.....	7
1.1.6.2. Actividad antioxidante	8
1.1.6.3. Evaluación de la actividad antioxidante.....	8
1.1.7. Antiinflamatorios	9
1.1.7.1. Respuesta inflamatoria.....	9
1.1.7.2. Actividad antiinflamatoria	10
1.1.7.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	10
1.1.8. Determinación de la vida útil	11

1.2. Objetivos	13
1.2.1. Objetivo General	13
1.2.2. Objetivos Específicos.....	13
CAPÍTULO II.-METODOLOGÍA	14
2.1. Materiales	14
2.1.1. Materiales	14
2.1.2. Equipos.....	14
2.1.3. Reactivos	15
2.2. Hipótesis.....	16
2.3. Métodos.....	17
2.3.1. Recolección del material vegetal	17
2.3.2. Preparación del material vegetal	17
2.3.3. Extracción con diferentes solventes	17
2.3.4. Determinación de fenoles totales	18
2.3.5. Análisis de datos	18
2.3.6. Determinación de flavonoides totales	19
2.3.7. Evaluación de la actividad antioxidante.....	19
2.3.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria	20
2.3.9. Estudio de estabilidad	22
2.3.9.1. Análisis de pH.....	22
2.3.9.2. Análisis de humedad	23
2.3.9.3. Análisis del contenido total de polifenoles y flavonoides.....	23
2.3.9.4. Análisis de la capacidad antioxidante	23
2.3.9.5. Análisis de la capacidad antiinflamatoria	24
2.3.10. Análisis de datos	24

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de barras 3D: Representación de la media del TPC.....	29
Figura 2. Gráfica de medias de los efectos principales del disolvente en función de la relación material vegetal/volumen de disolvente	30
Figura 3. Pronóstico de la vida útil del extracto de cáscara de piña en función de la variación del pH durante 30 días aproximadamente.	36
Figura 4. Pronóstico de la vida útil del extracto de cáscara de piña en función de la variación de la humedad.	37
Figura 5. Pronóstico de la vida útil del contenido total de compuestos fenólicos presentes en el extracto....	39
Figura 6. Pronóstico de la vida útil del contenido total de flavonoides presentes en el extracto.	41
Figura 7. Determinación de la vida útil de la actividad antioxidante del extracto.	43
Figura 8. Determinación de la vida útil en base al efecto antiinflamatorio del extracto.	45
Figura 9. Estándar de ácido gálico (GAE) utilizado para la cuantificación de fenoles totales.	59
Figura 10. Estándar de quercetina (QE) utilizado para la cuantificación de flavonoides totales.	59
Figura 11. Secado del material vegetal utilizando un deshidratador por convección.	61
Figura 12. Pesado de material vegetal: Cascara de piña (<i>Ananas comosus</i>).	61
Figura 13. Extracción de los compuestos bioactivos utilizando Etanol al 80% durante 30 minutos a 50 °C.	62
Figura 14. Placa de 96 pocillos: Determinación de flavonoides totales del extracto con mayor concentración de polifenoles.	62
Figura 15. Análisis de compuestos fenólicos y flavonoides totales.	63
Figura 16. Determinación de la actividad antioxidante de cada uno de los tratamientos aplicados.	63
Figura 17. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.	64

Figura 18. Desnaturalización de proteínas de la albúmina de huevo para la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto.	64
Figura 19. Determinación del porcentaje de humedad como parte del estudio de estabilidad.	65
Figura 20. Elaboración de placas para la determinación de fenoles y flavonoides totales.	65

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación del contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos y acuosos obtenidos a partir de la cáscara de piña (<i>Ananas comosus</i>).....	26
Tabla 2. Cuantificación del contenido de flavonoides totales en el extracto con mayor TPC obtenido a partir de la cáscara de piña (<i>Ananas comosus</i>).	28
Tabla 3. Capacidad antioxidante del extracto etanólico determinada mediante el ensayo DPPH.	31
Tabla 4. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico con mayor concentración de polifenoles (T1) procedente de la cáscara de piña y del fármaco estándar	33
Tabla 5. B: Análisis ANOVA para el contenido de fenoles totales presentes en el extracto procedente de la cáscara de piña.....	60

RESUMEN EJECUTIVO

Considerando el creciente interés en el aprovechamiento de desechos agrícolas, la cáscara de piña destaca como una fuente rica en compuestos bioactivos. La necesidad de sustituir antioxidantes y antiinflamatorios sintéticos, asociados a riesgos de salud, resalta la importancia de explorar fuentes naturales. Además, la evaluación de la vida útil es crucial para garantizar la estabilidad y eficacia del extracto en el tiempo.

Se inició con la extracción utilizando etanol y agua destilada como solventes en diferentes proporciones. La concentración de polifenoles se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, demostrando que el tratamiento con etanol fue el más eficiente. La evaluación de flavonoides totales se realizó al extracto con mayor concentración de polifenoles mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio. Además, el análisis de la actividad antioxidante se ejecutó mediante el ensayo DPPH resultando en un porcentaje de inhibición de 52.27 por ciento. También se realizó el análisis de la actividad antiinflamatoria mediante el ensayo de desnaturalización de la albúmina de huevo, revelando porcentajes significativos inhibición de la desnaturalización, siendo este del 73.15 por ciento. La estabilidad se analizó durante un mes y reveló un leve aumento en el pH y variación en la humedad, confirmando la robustez del extracto.

Este estudio proporciona información valiosa sobre la vida útil de un extracto de cáscara de piña, destacando su potencial como fuente natural de antioxidantes y antiinflamatorios. Mismo que contribuye a la expansión del conocimiento sobre el aprovechamiento de subproductos agrícolas y la búsqueda de soluciones naturales para desafíos de salud.

Palabras Clave: Biotecnología vegetal, gestión de residuos, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, compuestos bioactivos, cáscara de piña.

ABSTRACT

Considering the growing interest in the utilization of agricultural waste, pineapple peel stands out as a rich source of bioactive compounds. The need to replace synthetic antioxidants and anti-inflammatories, associated with health risks, emphasizes the importance of exploring natural sources. Additionally, the assessment of shelf life is crucial to ensure the stability and efficacy of the extract over time.

The extraction process began using ethanol and distilled water as solvents in different proportions. The concentration of polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu method, demonstrating that the ethanol treatment was the most efficient. Total flavonoid evaluation was performed on the extract with the highest polyphenol concentration using the colorimetric method of aluminum chloride. Furthermore, the analysis of antioxidant activity was conducted through the DPPH assay, resulting in an inhibition percentage of 52.27 percent. The analysis of anti-inflammatory activity was also carried out using the egg albumin denaturation assay, revealing significant percentages of denaturation inhibition, reaching 73.15 percent. Stability was analyzed over a month and showed a slight increase in pH and variation in humidity, confirming the robustness of the extract.

This study provides valuable information on the shelf life of pineapple peel extract, highlighting its potential as a natural source of antioxidants and anti-inflammatories. This contributes to the expansion of knowledge on the utilization of agricultural by-products and the search for natural solutions to health challenges.

Keywords: Plant biotechnology, waste management, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, bioactive compounds, pineapple peel.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

La reutilización de desechos se ha convertido en un desafío importante a nivel mundial, ya que representa problemas socioeconómicos y ambientales de bajo valor industrial (**Nath et al., 2023**). **Lourenço et al., (2021)**, ha demostrado que la cáscara de ciertas frutas como la piña, contiene una concentración de compuestos bioactivos mayor que la parte comestible, lo que ha generado un creciente interés por la bioconversión de residuos de frutas. En base a esto, el presente estudio se enfoca en evaluar la vida útil de un extracto procedente de la cáscara de piña, enfocándose en sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (**Ajayi et al., 2022**).

En los últimos años, Ecuador se ha convertido en uno de los principales productores de piña en América Latina y gracias a sus propiedades nutritivas y medicinales, su demanda en la industria ha aumentado significativamente (**Nath et al., 2023**). Como consecuencia, se ha generado una gran cantidad de residuos propensos al deterioro microbiano, puesto que contienen un alto porcentaje de lípidos, azúcar, vitaminas, albúminas y humedad (**Aili Hamzah et al., 2021**). El uso de vertederos, la incineración, el compostaje, etc., son algunos de los métodos más utilizados para la gestión de estos desechos, sin embargo, la mayoría son costosos y tienden a contaminar el ambiente puesto que contribuyen con las emisiones de gases de efecto invernadero (**Erb & Kliebenstein, 2020**).

Si bien los antioxidantes y antiinflamatorios sintéticos son ampliamente empleados en la industria debido a su estabilidad, se ha demostrado que su exceso puede aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas y ciertos tipos de cáncer (Serafini et al., 2020). Y aunque se han llevado a cabo varias investigaciones acerca de la extracción y aprovechamiento de estos metabolitos, aún es necesario profundizar en aquellos presentes en los residuos y su potencial en la industria (Lourenço et al., 2021).

1.1.2. Principales características de la piña (*Ananas comosus*)

Descripción taxonómica de la piña según (George et al., 2023):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Bromeliaceae

Género: *Ananas*

Especie: *comosus*

La piña, es un fruta tropical ampliamente apreciada por su aroma y sabor únicos (Aili Hamzah et al., 2021). Gracias a esto, se ha convertido en uno de los principales focos de exportación a nivel mundial después del plátano y el mango. Siendo la variedad “*Ananas comosus*” la más comercializada debido a su

versatilidad tanto para consumo directo como para procesamiento industrial **(Campos et al., 2020)**.

A nivel mundial, cuenta con una superficie total cultivada de 1.02 millones de hectáreas con una producción global de 24.8 millones de toneladas por año, dando como resultado grandes cantidades de subproductos, que en la mayoría de los casos son desechados como residuos **(Azevedo et al., 2021)**. Ecuador, especialmente la región litoral, ofrece un entorno favorable para el cultivo de piña, puesto que su baja altitud produce temperaturas cálidas y estables que oscilan entre 23 y 32 °C **(Nath et al., 2023)**.

Según el Ministerio de Agricultura, anualmente se cultivan alrededor 104 059 toneladas y más allá de su consumo como fruta fresca, existe una gran cantidad de productos procesados disponibles comercialmente **(Lourenço et al., 2020)**. La piña tiene una forma única con hojas y frutos anchos, presenta una longitud de 25 cm y un diámetro 15 cm aproximadamente. Su cáscara es rugosa y en su etapa temprana presenta una coloración verde que cambia a amarillo al madurar **(Nath et al., 2023)**. Además, presenta un alto contenido nutricional con un estimado de 47,8 mg de vitamina C y 13 mg de calcio por cada 100 g de piña **(Aili Hamzah et al., 2021)**.

La piña y sus subproductos (cascaras, tallos, corazón y corona), son una fuente abundante de bromelina, enzima de alto interés comercial debido a sus propiedades farmacéuticas y bioquímicas. Además, contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios con alta actividad antioxidante y antiinflamatoria **(Bansod et al., 2023)**. Siendo los polifenoles y flavonoides los principales compuestos bioactivos presentes en la composición morfológica del fruto **(Mohd Ali et al., 2020)**. Razón por la cual, la extracción de dichos metabolitos es el paso más importante para

convertirlos en productos útiles (**Lourenço et al., 2021**). **Ávila et al., (2020)**, establece que la piña tiene un contenido de polifenoles de 652,8 en equivalentes de miligramos de ácido gálico por gramos de peso seco de la muestra (mg GAE) /g DW). Por otro lado, **Lourenço et al., (2020)**, presentó un valor de 2784,1 mg GAE/g DW en el total de residuos.

1.1.3. Compuestos bioactivos de plantas

Todos los compuestos presentes en el sistema biológico pueden clasificarse de forma general en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios, incluyen sustancias fundamentales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, como carbohidratos, proteínas, lípidos y aminoácidos (**Aili Hamzah et al., 2021**). A diferencia de los metabolitos secundarios que se generan en una fase posterior al crecimiento y se dividen en terpenos, terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (**Erb & Kliebenstein, 2020**).

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas fundamentales para la supervivencia y sustento de las plantas. Se encuentran en la matriz celular y se producen a través del metabolismo secundario en respuesta a diversos factores de estrés ya sean bióticos o abióticos, como temperaturas extremas, sequías, infección por patógenos, consumo por herbívoros, entre otros (**Sarangi et al., 2022**). La síntesis de estos compuestos representa una estrategia adaptativa de las plantas confiriéndole efectos farmacológicos beneficiosos para la salud humana y por ende de interés industrial (**Bansod et al., 2023**).

1.1.4. Principales compuestos bioactivos de la cáscara de piña

Los residuos del procesamiento de piña, tardan alrededor de 13 meses en descomponerse y constituyen alrededor del 50% del total de la fruta, donde solo la cáscara representa el 22% (**Aili Hamzah et al., 2021**). **Khedkar et al., (2017)**, reporta que la cantidad de fibra cruda, grasa y proteínas de las cáscaras de piña es del 23,71%, 0,46% y 0,33%, respectivamente. Además, estudios presentados por **Banerjee et al., (2018)**, establecen que este residuo presenta alta actividad antioxidante y antiinflamatoria debido a la presencia de vitaminas, compuestos fenólicos y flavonoides como la miricetina. Por otro lado, **Campos et al., (2020)**, ha demostrado que la cáscara contiene un total de 298,6 mg GAE/g DW y 163.2 mg de flavonoides expresados en equivalentes de mg de quercetina (QE)/g DW.

Los polifenoles son compuestos orgánicos que contienen múltiples grupos fenólicos en su estructura. Un grupo fenólico consiste en un anillo aromático que lleva un grupo hidroxilo (-OH). Dichos anillos, se encuentran unidos entre sí mediante enlaces simples o dobles, formando una configuración molecular compleja que no solo contribuye con sus propiedades antioxidantes, sino que también imparte diversidad estructural, influyendo directamente en sus actividades biológicas (**Ji et al., 2020**). Dichos compuestos se pueden clasificar de forma general en flavonoides y fenoles no flavonoides (**Kurek-Górecka et al., 2013**).

Los flavonoides son compuestos reconocidos por su estructura química. Su actividad antioxidante se atribuye a la presencia de hidroxilos que neutralizan los radicales libres protegiendo a las células del daño oxidativo. Por otro lado, su anillo heterocíclico se asocia con su capacidad para modular vías de señalización celular inflamatorias, otorgándoles propiedades antiinflamatorias (**Serafini et al., 2020**). La miricetina, kaempferol y quercetina son los flavonoides más abundantes de la piña (**Hossain & Rahman, 2011**).

1.1.5. Extracción de compuestos bioactivos

Los métodos de extracción son técnicas utilizadas para separar y obtener diversos metabolitos de interés industrial, estos se clasifican en convencionales y no convencionales. La selección del método depende de factores como la naturaleza de los compuestos a extraer, la matriz de origen, y la aplicación prevista de los extractos para su posterior caracterización y evaluación de actividades biológicas **(Wang et al., 2021)**.

Los métodos convencionales o extracción sólido - líquido convencional, incluyen procesos simples de maceración en un solvente, ya sea con o sin agitación, a presión atmosférica y a temperaturas que van desde la temperatura ambiente hasta el punto de ebullición. Entre estos, la percolación, maceración, infusión, reflujo, uso de solventes y extracción Soxhlet **(Zwingelstein et al., 2020)**.

Por otro lado, los métodos no convencionales son enfoques más innovadores y avanzados que buscan mejorar la eficiencia y reducir el tiempo de extracción. Entre estos, la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), extracción asistida por microondas (MAE) y extracción con fluidos supercríticos (SFE). Y aunque estos métodos están ganando popularidad debido a su capacidad para mejorar la selectividad y eficiencia de los procesos, también presentan ciertas desventajas que deben considerarse (elevados costos iniciales, complejidad operativa, posible degradación de compuestos termosensibles, etc.) **(Ahmad et al., 2022)**.

La técnica de extracción por solventes, es una de las más utilizadas debido a su alta selectividad y bajo costo. Se basa en la capacidad de los solventes para disolver compuestos de interés en función de su polaridad **(Do et al., 2014)**. Tanto el etanol

como el agua son solventes polares, lo que los hace idóneos para la extracción de polifenoles puesto que permite establecer enlaces con sus grupos polares, facilitando su transferencia desde la matriz sólida a la fase líquida (**Roohinejad et al., 2017**).

1.1.6. Antioxidantes

1.1.6.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), frente a la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlos (**Ajagun-Ogunleye & Ebuehi, 2020**). Este desequilibrio puede provocar reacciones en cadena que amplifican el estrés oxidativo y promueven la progresión de diversas enfermedades debido al daño celular que producen (**Ávila et al., 2020**).

Además de la aterosclerosis, la insuficiencia renal crónica y la diabetes mellitus, se ha vinculado la presencia de estos radicales libres con otras condiciones de salud significativas, como enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, Alzheimer y Parkinson), trastornos inflamatorios crónicos, enfermedades cardíacas, trastornos metabólicos y ciertos tipos de cáncer (**Deng et al., 2021**). Por esto, el estudio de los compuestos bioactivos presentes en la cáscara de piña, es fundamental en la reducción del estrés oxidativo y, por ende, en la mitigación del riesgo de desarrollar estas enfermedades (**Cuffaro et al., 2023**).

1.1.6.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se refiere a la capacidad de un compuesto para contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres (**Lourenço et al., 2020**). El mecanismo de acción de los antioxidantes se da por donación de electrones, es decir que estos compuestos tienen la capacidad de neutralizar radicales libres mediante la donación segura de electrones, estabilizando moléculas inestables y previniendo el daño oxidativo (**Carsono et al., 2022**).

Dicha actividad es propia de los antioxidantes, y aunque se encuentran en el organismo de forma endógena también se pueden adquirir exógenamente (**Ji et al., 2020**). Los antioxidantes sintéticos más utilizados son el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT) debido a su estabilidad. Sin embargo, se ha asociado estos compuestos con alergias en la piel, enfermedades neurodegenerativas, gastrointestinales y cancerígenas (**Ávila et al., 2020**).

1.1.6.3. Evaluación de la actividad antioxidante

Existen diversos métodos in vitro para evaluar la efectividad de un antioxidante, entre estos, aquellos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y los basados en la transferencia de electrones (ET) (**Mendonça et al., 2022**). Además, los ensayos que evalúan la capacidad antioxidante total (TAC) utilizan métodos ET mixtos (**Gulcin, 2020**).

El ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), de tipo HAT mide la disminución de la fluorescencia de la muestra como resultado de un

cambio estructural causado por oxidación (**Sasikumar et al., 2020**). Por otro lado, el ensayo de poder antioxidante reductor del ion férrico (FRAP) de tipo ET, consiste en la reducción del complejo incoloro Fe^{3+} -TPTZ convirtiéndolo en uno de color azul Fe^{2+} -TPTZ, al reaccionar con compuestos antioxidantes (**Mendonça et al., 2022**).

Finalmente, el ensayo DPPH (2,20-difenil-1-picrylhydrazyl radical) de tipo TAC, se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al reactivo DPPH, convirtiéndolo en una molécula no radicalaria y más estable. Resultando en un cambio de coloración que va de violeta a amarillo debido a cambios en su estructura electrónica y, por ende, en la absorción de luz (**Lourenço et al., 2021**). **Hossain & Rahman, (2011)**, indican que los extractos de cáscara de piña presentan un porcentaje de inhibición entre el 41.8 y 84.3%.

1.1.7. Antiinflamatorios

1.1.7.1. Respuesta inflamatoria

La inflamación, como primera respuesta del sistema inmunitario ante lesiones, infecciones o irritaciones, involucra la activación de células inmunitarias que liberan sustancias químicas, incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Aunque estas sustancias contribuyen a la cicatrización, su exceso puede causar daño celular (**Zhu et al., 2018**).

En la mayoría de los casos, la respuesta inflamatoria es específica y autocontrolada. No obstante, cuando se desregula, la inflamación puede extenderse

causando daño tisular innecesario. Esta desregulación puede desencadenar enfermedades autoinmunes y, si se dirige erróneamente a tejidos sanos, podría contribuir con el desarrollo de enfermedades crónicas (Cuffaro et al., 2023).

1.1.7.2. Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se refiere a la capacidad de una sustancia para reducir la respuesta inflamatoria en el cuerpo. Esto se logra mediante la regulación de la liberación de mediadores inflamatorios y la inhibición de enzimas implicadas en la inflamación. Tanto los compuestos con propiedades antioxidantes como los antiinflamatorios pueden ser endógenos o adquiridos externamente (da Costa et al., 2015).

No obstante, cuando la eficacia de estos antiinflamatorios naturales no es suficiente, se recurre a medicamentos no esteroideos (AINE), ampliamente utilizados debido a su estabilidad (Serafini et al., 2010). Estos AINE actúan reduciendo la producción de mediadores proinflamatorios, como citocinas y prostaglandinas, o interfiriendo con enzimas y vías inflamatorias. Sin embargo, su uso prolongado puede conllevar riesgos para la salud, subrayando la necesidad de explorar alternativas de origen natural (Morais et al., 2022).

1.1.7.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

La evaluación de la actividad antiinflamatoria, implica analizar su capacidad para reducir la respuesta inflamatoria. Los métodos in vivo proporcionan información

sobre la interacción directa entre el compuesto y las células inflamatorias, siendo los más comunes los ensayos de inhibición enzimática, que miden la capacidad de un compuesto para inhibir enzimas inflamatorias. El ensayo de desnaturalización de la albúmina, se basa en evaluar la capacidad de una sustancia para inhibir la desnaturalización cuando se somete a cambios de pH o temperatura (**Serafini et al., 2010**). Estudios presentados por **Maleki et al., (2019)**, indican porcentajes de inhibición del 10 al 90% para diferentes extractos.

1.1.8. Determinación de la vida útil

El análisis de la vida útil de un extracto permite garantizar la calidad y seguridad del producto en el tiempo. Ecuador, al ser un miembro del ARCSA, toma en cuenta varias guías y normas internacionales para la evaluación de productos farmacéuticos. Incluyendo la guía científica ICH específicamente la norma ICH Q1A(R2) enfocada en la estabilidad de las sustancias y productos medicinales nuevos. Aunque esta norma, no proporciona información específica de extractos naturales, presenta recomendaciones generales. Entre estos, el diseño del estudio de estabilidad, fundamental para la estimación de la vida útil, que incluye la selección adecuada de las condiciones de almacenamiento y determinación de intervalos de muestreo. Además, en los parámetros de prueba se establece la importancia de analizar la degradación de los componentes en función de la actividad terapéutica esperada. Un estudio de estabilidad se puede realizar en tiempo real es decir a condiciones normales o en tiempo acelerado donde se somete a condiciones extremas para acelerar su deterioro (**European Medicines Agency, 2003**).

Dentro de un estudio de estabilidad, tanto el pH como la humedad del extracto son factores fisicoquímicos de gran importancia al momento de pronosticar el tiempo

de vida útil de un extracto. El análisis del pH por un lado, es esencial para entender cómo evoluciona la acidez del extracto, ya que la estabilidad de los compuestos bioactivos presentes puede variar según el pH del medio en el que se encuentran. En general, los compuestos fenólicos y flavonoides tienden a ser más estables en un entorno ácido (**Zhu et al., 2018**).

Por otro lado, la reducción de la humedad en un extracto afecta la estructura molecular de los metabolitos bioactivos, promoviendo la oxidación de los polifenoles y comprometiendo su integridad. La falta de agua también puede dar lugar a la formación de agregados, afectando la biodisponibilidad de los polifenoles, y provocar una pérdida de solubilidad, alterando su capacidad para interactuar en procesos biológicos (**Macharia et al., 2023**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la vida útil de un extracto obtenido de la cáscara de piña (*Ananas comosus*) con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Extraer los polifenoles de la cáscara de piña (*Ananas comosus*) mediante el uso de solventes.
- Analizar la capacidad antioxidante y el efecto antiinflamatorio del extracto con mayor concentración de polifenoles.
- Estimar el tiempo de vida útil del extracto procedente de la cáscara de piña (*Ananas comosus*).

CAPÍTULO II.-METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales

- Vasos de precipitación (500 ml, 250 ml, 80ml)
- Probeta (50 ml)
- Frascos ámbar (60 ml, 250 ml)
- Tubos de ensayo (5 ml)
- Micropipetas (10 – 100 μ l, 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l)
- Puntas de micropipeta
- Placa de 96 pocillos
- Tubos falcón (50 ml)
- Tubos eppendorf (1.5 ml)
- Matraz Erlenmeyer (250 ml)
- Gradilla
- Papel filtro
- Agitador magnético
- Mortero y pistilo
- Termómetro

2.1.2. Equipos

- Deshidratador por convección
- Plancha de calentamiento
- Refrigerador
- Espectrofotómetro UV
- Balanza analítica
- Balanza de humedad
- Potenciómetro
- Baño térmico
- Centrífuga

2.1.3. Reactivos

- Etanol 80%
- Hipoclorito de sodio al 1%
- Carbonato de sodio 7% (p/v)
- Cloruro de aluminio 2% (p/v)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Ácido gálico
- Quercetina
- Solución DPPH
- Solución Trolox
- Metanol
- Diclofenaco de sodio
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Fosfato de disodio
- Fosfato monopotásico

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

No hay diferencias significativas en el contenido total de polifenoles entre los tratamientos.

2.2.2. Hipótesis alternativa

Existen diferencias significativas en el contenido total de polifenoles entre los tratamientos.

2.2.3. Variables

Variables dependientes

- Contenido total de polifenoles

Variables independientes

- Disolventes (Etanol 80%, agua destilada)
- Relación biomasa/volumen de disolvente (1:20, 1:30)

2.3. Métodos

2.3.1. Recolección del material vegetal

Las cascaras de piña se obtuvieron de los desechos resultantes de la producción de jugos del Mercado Central ubicado en la Ciudad de Ambato y se trasladaron a los laboratorios de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para su posterior tratamiento.

2.3.2. Preparación del material vegetal

Las cascaras de piña se lavaron con agua simple para eliminar la suciedad superficial. Se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada para eliminar los restos de cloro. El proceso de secado se llevó a cabo en un deshidratador por convección a una temperatura de 50° centígrados durante 55 horas aproximadamente. Las cascaras secas se trituraron utilizando una licuadora hasta la obtención de un polvo fino y homogéneo, mismo que se almacenó en bolsas libres de aire hasta su uso (**Hossain & Rahman, 2011**).

2.3.3. Extracción con diferentes solventes

El proceso de extracción se llevó a cabo utilizando etanol al 80% y agua destilada como disolventes con dos relaciones biomasa/volumen de disolvente (1:20 y 1:30). Para cada tratamiento se colocó en un vaso de precipitación el disolvente y se llevó

a una plancha de calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 50°C, seguidamente se adicionó el material vegetal previamente pesado en la balanza analítica y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. El extracto resultante se filtró y se almacenó en frascos ámbar en refrigeración hasta su uso (**Lourenço et al., 2021**).

2.3.4. Determinación de fenoles totales

La determinación del contenido total de polifenoles se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu. En una placa de 96 pocillos se mezclaron 10 µl del extracto en una dilución 1:10, 10 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 130 µl de agua destilada, se dejó reaccionar durante 5 minutos y se adicionó 100 µl de carbonato de sodio al 7% (p/v). La placa se incubó durante 90 minutos en ausencia de luz y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Este proceso se realizó por triplicado para cada uno de los extractos. Para la calibración, se realizó una curva estándar de ácido gálico (GAE) en concentraciones de 10 a 100 mg/L. El contenido fenólico se expresó como equivalentes de miligramos de ácido gálico por gramos de peso seco de la muestra (mg GAE/g DW) (**Lourenço et al., 2020**).

2.3.5. Análisis de datos

Se aplicó un diseño experimental 2², donde el factor A fue el tipo de disolvente (etanol al 80% y agua destilada) y el factor B fue la relación material vegetal/volumen de disolvente (1:20 y 1:30). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics que cuenta con una prueba gratuita de 30 días, utilizando como variable de respuesta la concentración total de polifenoles

presente en cada uno de los extractos. Esto mediante un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95%, $p < 0,05$.

2.3.6. Determinación de flavonoides totales

El ensayo de determinación de flavonoides totales se realizó al extracto con mayor concentración de polifenoles mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio. Para esto, en una placa de 96 pocillos se mezclaron 60 μ l del extracto en dilución 1:10 con 120 μ l de $AlCl_3$ al 2% (p/v) y se incubó durante 60 minutos en ausencia de luz y a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 420 nm. Para la calibración, se realizó un curva estándar con diluciones seriadas de quercetina (QE) en un rango 10 a 100 mg/L. Los resultados se expresaron en equivalentes de miligramos de quercetina por gramos de peso seco de la muestra (mg QE/ g DW) (Pandey et al., 2016).

2.3.7. Evaluación de la actividad antioxidante

Al extracto con mayor concentración de polifenoles se le realizó la evaluación de la actividad antioxidante, siguiendo la metodología establecida por Bobo et al., (2015), con modificaciones. En una placa de 96 pocillos se adicionó 20 μ l de extracto en dilución 1:10 y 180 μ l de solución DPPH, como control se utilizó 20 μ l de agua destilada/etanol junto con 180 μ l de solución DPPH y como blanco 180 μ l de metanol-agua (80:20) y 20 μ l de agua destilada/etanol. Se dejó incubar la placa en ausencia de luz durante 40 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm.

Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[1 - \frac{Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control} - Abs_{blanco}} \right] \times 100$$

Ecuación 1. Determinación de porcentaje de inhibición.

$Abs_{muestra}$ = Absorbancia de la solución de DPPH con el extracto

Abs_{blanco} = Absorbancia de la solución de DPPH con metanol-agua

$Abs_{control}$ = Absorbancia de la solución de DPPH con agua destilada

Adicionalmente, se preparó una solución madre de Trolox (500 μM) disolviendo 0.0125 g de reactivo de Trolox en 100 mL de metanol-agua (50:50) y se sometió a agitación hasta homogenizar completamente. Posteriormente se elaboró una curva de calibración en concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μM . Cada uno de los análisis se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la muestra y actividad equivalente a Trolox ($\mu\text{M/g}$ de DW).

2.3.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Al extracto con mayor concentración de polifenoles se realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el ensayo de desnaturalización de la albúmina siguiendo la metodología establecida por **Dharmadeva et al., (2018)**, con modificaciones.

En primer lugar, para la obtención de la ovoalbúmina se separó la clara del huevo y se mezcló con 100 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Posteriormente se colocó la muestra en tubos falcón de 50 ml y se centrifugó a 4000 RPM durante 10 minutos. La muestra se almacenó hasta su análisis.

Como fármaco estándar se utilizó diclofenaco de sodio ya que es un potente antiinflamatorio. Tanto para el extracto como para el fármaco, se prepararon diluciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. Posteriormente, en tubos de ensayo se mezclaron 2 ml de muestra (extracto o diclofenaco de sodio), 2.8 ml de PBS (pH 6.4) previamente preparado y 0.2 ml de albúmina de huevo. Este proceso se realizó para cada una de las diluciones, se dejó reaccionar durante 15 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm (antes de la desnaturalización). Para inducir el proceso de desnaturalización, los tubos de ensayo se calentaron en baño térmico a una temperatura de 70°C durante 10 minutos, se dejó enfriar 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 660 nm.

Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times \left[1 - \frac{Abs_{mc} - Abs_{mf}}{Abs_{cc} - Abs_{mf}} \right]$$

Ecuación 2. Determinación del porcentaje de inhibición.

Abs_{mc} = Absorbancia de la muestra después de la desnaturalización (extracto/diclofenaco sódico)

Abs_{mf} = Absorbancia de la muestra antes de la desnaturalización (extracto/diclofenaco sódico)

Abs_{cc} = Absorbancia del control calentado (agua destilada)

2.3.9. Estudio de estabilidad

La determinación de la vida útil se realizó al extracto con mayor concentración de polifenoles. El contenido total del extracto (240 ml) se dividió en 8 partes iguales (30 ml) y se almacenó en un refrigerador manteniendo la temperatura en un rango de 4 a 8° C. Para esto se utilizaron frascos pequeños de tipo ámbar, caracterizados por sus propiedades de filtrado de la luz ultravioleta (UV), lo que le permite proteger el contenido de la degradación causada por la exposición a la luz solar o artificial. Además, la tapa está diseñada herméticamente, lo que ayuda a evitar la entrada de aire u otros contaminantes que podrían afectar la calidad y estabilidad del extracto. Los parámetros a analizar fueron: contenido total de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y antiinflamatoria, pH y humedad del extracto. Los análisis se realizaron por triplicado durante un mes aproximadamente (**Putnoky et al., 2013**).

2.3.9.1. Análisis de pH

La determinación del pH del extracto se realizó mediante el método potenciométrico. Para esto, se tomó una alícuota del extracto en dilución 1:10, se

colocó en un vaso de precipitación y se sumergió el electrodo hasta estabilizar. El análisis se realizó por triplicado cada 4 días durante un mes (**Brainina et al., 2019**).

2.3.9.2. Análisis de humedad

Para la determinación del porcentaje de humedad del extracto se tomó 2 ml del extracto y se colocó en la balanza de humedad. Los datos se registraron por triplicado y el análisis se realizó cada 4 días durante un mes (Aili Hamzah et al., 2021).

2.3.9.3. Análisis del contenido total de polifenoles y flavonoides

El análisis del contenido total de polifenoles y flavonoides totales se realizó por triplicado cada 4 días en el lapso de un mes. Para esto se siguió la metodología establecida en los puntos 2.3.4 y 2.3.6 respectivamente.

2.3.9.4. Análisis de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto se realizó siguiendo la metodología establecida en el punto 2.3.7. El análisis se realizó por triplicado cada 15 días durante un mes y el porcentaje de inhibición se determinó mediante la **ecuación 1**.

2.3.9.5. Análisis de la capacidad antiinflamatoria

La determinación de la capacidad antiinflamatoria del extracto se realizó siguiendo la metodología establecida en el punto 2.3.8. El análisis se realizó por triplicado cada 15 días durante un mes y el porcentaje de inhibición se determinó mediante la **ecuación 2**.

2.3.10. Análisis de datos

Utilizando el software Minitab que cuenta con una prueba gratuita de 30 días, se realizaron las comparaciones de las medias de los datos recolectados durante un mes de cada una de las pruebas. Mediante las funciones que ofrece el paquete estadístico, se estimó el pronóstico de tiempo de vida útil del extracto.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Extracción y caracterización de compuestos bioactivos presentes en la cáscara de piña (*Ananas comosus*)

Los extractos procedentes de la cáscara de piña (*Ananas comosus*) se obtuvieron mediante extracción por solventes, técnica reconocida por su eficacia para la obtención de diversos metabolitos bioactivos, entre estos, fenoles y flavonoides (Ajayi et al., 2022). Tanto el etanol como el agua son solventes versátiles y de bajo costo que permitieron obtener un alto rendimiento en términos de concentración (Pitts et al., 2021). Razón por la cual, el presente estudio, utilizó etanol al 80% y agua como potenciales disolventes para el proceso de extracción. Siendo el etanol aquel que presentó mejores resultados.

El análisis de compuestos fenólicos totales (TPC) se realizó en función de una curva de calibración de ácido gálico (GAE) (ANEXO A1) y los resultados se expresaron como mg GAE/g DW. En la **tabla 1.**, se presenta el contenido total de fenoles obtenido a partir de la ecuación de regresión lineal $A_{765nm} = 0.0022 [GAE] + 0.1227$ ($R^2 = 0.9988$).

Tabla 1 Cuantificación del contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos y acuosos obtenidos a partir de la cáscara de piña (*Ananas comosus*).

Tratamiento	Disolvente	Relación biomasa/volumen de disolvente	Fenoles totales (mg GAE/g DW)
T1	Etanol 80%	1:20	75.59 ± 0.54
T2		1:30	48.22 ± 0.52
T3	Agua	1:20	44.46 ± 1.04
T4		1:30	43.53 ± 2.50

Nota: Los resultados presentados son los promedios de cada tratamiento ± desviación estándar.

El análisis de TPC de los extractos de la cascara de piña resultante se puede observar en la **tabla 1**, donde se evidencia que el uso de etanol al 80% y la relación material vegetal/volumen de disolvente 1:20 son el tratamiento más eficiente en términos de extracción, dando como resultado 75.59 ± 0.54 mg GAE/g DW, trabajando con una temperatura de extracción de 50°C durante 30 minutos. Sin embargo, un estudio presentado por **Campos et al., (2020)**, establece que el extracto etanólico de cáscara de piña presenta un valor de TPC de 298.6 mg GAE/g DW. y **Lourenço et al., (2021)**, presentó resultados que oscilan entre 101.98 mg GAE/g DW para extractos acuosos y 257,85 mg GAE/g DW para extractos etanólicos, ambos a 55°C durante 25 minutos aproximadamente.

La diferencia significativa entre dichos resultados puede atribuirse a dos factores clave: el estado de madurez del material vegetal y el método de extracción empleado. En el presente estudio, se utilizó cáscara de piña madura ya que es la comúnmente utilizada para la elaboración de jugos. A diferencia de los resultados

presentados por **Campos et al., (2020)** y **Lourenço et al., (2021)**, donde se empleó cáscara de piña en un estado inicial de madurez (aún verde) y métodos de extracción no convencionales. Por lo tanto, es posible afirmar que el contenido de fenoles, varía considerablemente en función del estado de madurez de la fruta y el método de extracción utilizado, demostrado que tanto el tiempo de extracción como la temperatura no afectan significativamente al TPC del extracto (**Anbesaw, 2021**).

Acorde a lo mencionado por **Meena et al., (2022)**, el rendimiento de un proceso de extracción depende principalmente del tipo de solvente utilizado y su polaridad. Es decir, los solventes polares son eficientes para extraer compuestos polares, ya que pueden establecer interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales de compuestos que exhiben polaridad, como los polifenoles (**Sehaki et al., 2023**).

Aunque el agua es un solvente más polar que el etanol, la superioridad de la eficiencia de extracción con etanol al 80% se justifica debido a la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de piña y su afinidad por el solvente, además de la influencia de otros factores como la concentración, temperatura y tiempo de exposición del solvente frente a la matriz vegetal de interés (**Khedkar et al., 2017**). En base a los resultados obtenidos es posible afirmar que los metabolitos presentes en los extractos se encuentran en un rango de polaridad cercano al del etanol al 80%. Análisis que a su vez concuerda con lo mencionado por **Herrera-Pool et al., (2021)**, donde se establece que los compuestos fenólicos son más afines con disolventes menos polares que el agua, especialmente en material vegetal procedente de frutas.

En cuanto a la relación del material vegetal/volumen de disolvente, se observa que a medida que disminuye el volumen de disolvente aumenta el contenido total de polifenoles obtenidos durante la extracción. Datos similares a lo presentado por

Ahmad et al., (2022), donde se menciona que dicho patrón se debe a que el disolvente se encuentra en un equilibrio con la cantidad de material vegetal, permitiendo que la superficie de contacto facilite la transferencia de fenoles al medio acuoso. Sin embargo, estudios presentados por **Meena et al., (2022)** y **Orsat & Routray, (2017)**, afirman que con un mayor volumen de disolvente aumenta el área de contacto del solvente con la biomasa, lo que genera mayor eficiencia de extracción.

Por otro lado, el análisis del contenido de flavonoides totales (TFC) se realizó en función de una curva de calibración de quercetina (QE) (**ANEXO A2**) y los resultados se expresaron como mg QE/g DW. En la **tabla 2**, se presenta el contenido total de flavonoides obtenido a partir de la ecuación de regresión lineal $A_{420nm} = 0.0163 [GAE] + 0.0002$ ($R^2 = 0.9986$).

Tabla 2. Cuantificación del contenido de flavonoides totales en el extracto con mayor TPC obtenido a partir de la cáscara de piña (*Ananas comosus*).

Disolvente	Relación Biomasa/volumen de disolvente	Flavonoides totales mg QE/g DW
Etanol 80%	1:20	16.67 ± 0.29

Nota: El resultado es el valor promedio ± desviación estándar.

En base a lo reportado en la **tabla 2**, el extracto etanólico con mayor cantidad de polifenoles presenta un TFC de 16.67 ± 0.29 mg QE/g DW. Resultado que es significativamente menor al presentado por **Campos et al., (2020)**, donde se reportó un total de 163.2 mg de flavonoides mg QE/g DW, evidenciando que el estado de madurez del material vegetal y el método de extracción utilizado influyen directamente en la concentración final de fenoles y flavonoides.

Por otro lado, **Orsat & Routray, (2017)**, informaron un valor de 2.33 mg QE/g DW, mientras que **Pandey et al., (2016)**, un valor de 7.76 mg QE/g DW, utilizando concentraciones de etanol al 30 y 70% respectivamente, valores bajos en comparación a los obtenidos en el presente estudio (**tabla 2**). Estos resultados confirman que la eficiencia de extracción está fuertemente influenciada por la afinidad de polaridad entre el solvente y el compuesto objetivo. Como se discutió previamente, el etanol al 80% se presenta como el solvente más adecuado para la extracción de tanto de fenoles como de flavonoides (**Herrera-Pool et al., 2021**).

3.1.2. Análisis estadístico

Con el análisis de varianza ANOVA (**ANEXO B**), se demostró que tanto el disolvente como la relación del material vegetal/volumen de disolvente tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de fenoles totales expresados en mg GAE/g DW, con un nivel de confianza del 95.0%, ($p < 0.05$).

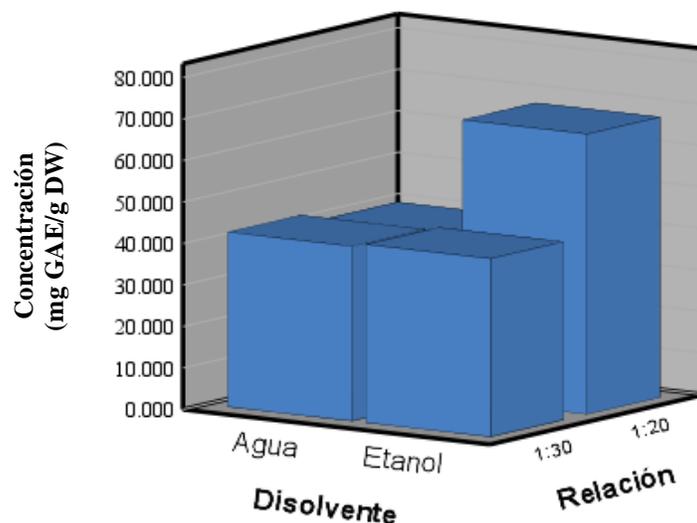


Figura 1. Gráfico de barras 3D: Representación de la media del TPC.

En la **figura 1**, es posible visualizar la eficiencia de extracción en el tratamiento 1, donde se utilizó etanol al 80% en una relación material vegetal/volumen de disolvente 1:20. Además, se evidencia que el agua como solvente y la relación 1:30 presentan baja eficiencia para todos los casos.

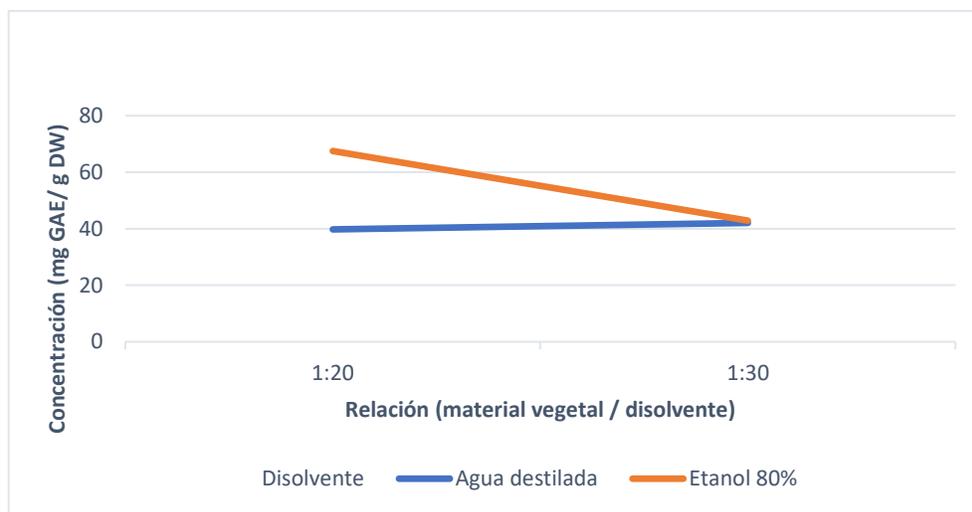


Figura 2. Gráfica de medias de los efectos principales del disolvente en función de la relación material vegetal/volumen de disolvente

En la **figura 2**, se muestran los efectos principales de la TPC en base a la relación y el disolvente utilizados durante el proceso de extracción. A partir de dicha gráfica, se puede afirmar rápidamente que a menor cantidad de disolvente mayor es la concentración de polifenoles presentes en el extracto para ambos casos, siendo el etanol al 80% aquel con una eficiencia superior.

Los resultados presentados en la **tabla 1**, sugieren que el factor que influye directamente en la eficiencia de extracción y por ende en la concentración total de fenoles, es el solvente utilizado. Esto se evidencia al comparar T3 y T4, donde se emplea el mismo disolvente con dos relaciones diferentes, y la variación es mínima. Por otro lado, T1 y T3, que utilizan diferentes solventes pero la misma relación, muestran diferencias altamente significativas.

En base a los resultados obtenidos en cuanto a la concentración total de polifenoles presentes en el extracto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Es decir, existen diferencias significativas en el contenido total de polifenoles entre al menos dos tratamientos.

3.1.3. Evaluación de actividades biológicas

3.1.3.1. Análisis de la actividad antioxidante

Los antioxidantes son moléculas producidas por las plantas de forma natural como mecanismo de defensa frente a situaciones de estrés. Dichos compuestos, tienen la capacidad contrarrestar los efectos de negativos producidos por el estrés oxidativo como resultado de una sobreproducción de ROS y RNS (Morais et al., 2022).

La capacidad antioxidante del extracto con mayor concentración de polifenoles se determinó mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y los resultados, se expresaron como el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH, calculado mediante la *Ecuación 1.*, así como también, se presentan los micromoles equivalentes de Trolox/L (**tabla 3**).

Tabla 3 Capacidad antioxidante del extracto etanólico determinada mediante el ensayo DPPH.

Disolvente	Relación biomasa/volumen de disolvente	% Inhibición de radicales DPPH	$\mu\text{mol Eq. Trolox /L}$
Etanol 80%	1:20	52.27 ± 1.45	322.447 ± 6.34

Nota: El resultado es la media de tres replicas \pm desviación estándar.

Este ensayo mide la eficiencia de reducción de los antioxidantes presentes en el extracto hacia el radical libre DPPH. Es decir, cuando se añade un antioxidante al radical DPPH, puede ocurrir una reducción directa mediante la transferencia de electrones o la eliminación de radicales por la transferencia de átomos de hidrógeno. En ambos casos, el resultado es la neutralización del radical DPPH, lo que se refleja en un cambio de coloración de violeta intenso a amarillo (**Noui et al., 2022**).

La actividad inhibitoria del radical libre DPPH presente en el extracto etanólico fue de 52.27 ± 1.45 % con 322.447 ± 6.34 μmol de equivalentes Trolox/L. Resultados similares a los presentados por **Hossain & Rahman, (2011)**, donde se indica que el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH se encuentra entre el 41.8 y 84.3%, debido a que se utilizaron diferentes solventes (etanol y metanol) con concentraciones del 60 y 80% respectivamente. Este patrón refuerza la idea de que la relación de polaridad entre el solvente y el material vegetal impacta directamente en los metabolitos presentes en el extracto, así como en la eficacia de sus actividades biológicas.

En base a los resultados obtenidos del TPC y TFC (tablas 1 y 2), es posible evidenciar que la cantidad fenoles y flavonoides presentes en el extracto se relaciona directamente con el potencial antioxidante. Esto debido a la cantidad de grupos hidroxilo presentes en la estructura química de dichos compuestos, mismos que son efectivos para estabilizar los radicales libres al interactuar con ellos y evitar que causen daño a las células (**Hossain & Rahman, 2011**). Además, **Hamoudi et al., (2021)**, menciona que los compuestos fenólicos presentes en matrices vegetales son el segundo grupo de metabolitos con mayor actividad antioxidante.

3.1.3.2. Análisis del efecto antiinflamatorio

La actividad antiinflamatoria se determinó también para el extracto con mayor contenido fenólico (T1). Para esto se midió la actividad antiinflamatoria del extracto, utilizando diclofenaco de sodio como fármaco estándar. Los resultados se presentan en la **tabla 4**, mismos que fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina del huevo.

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico con mayor concentración de polifenoles (T1) procedente de la cáscara de piña y del fármaco estándar

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición (%)	
	Extracto	Diclofenaco de sodio
1000	73.1550 \pm 0.23	96.7811 \pm 1.44
500	65.4305 \pm 1.22	91.9872 \pm 0.79
200	57.6744 \pm 0.78	67.5758 \pm 1.63
100	16.3842 \pm 2.32	31.1475 \pm 2.02

Nota: los resultados son los promedio \pm desviación estándar.

Mediante este ensayo se evaluó la capacidad del extracto procedente de la cáscara de piña para inhibir la desnaturalización de proteínas sometándolo a condiciones de estrés térmico. Observándose un efecto antiinflamatorio en todas las concentraciones evaluadas (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) (**tabla 4**). La albúmina de huevo puede utilizarse como un componente para simular las condiciones biológicas en el cuerpo. Se emplea para crear un entorno que imita la respuesta inflamatoria y evaluar cómo ciertos compuestos o sustancias pueden afectar esta respuesta (**da Costa et al., 2015**).

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la *ecuación 2.*, dando como resultado una inhibición máxima del 73.15% a una concentración de 1000 µg/ml, con una disminución proporcional a medida que la concentración baja, alcanzando un valor mínimo del 16.38% a 100 µg/ml. En comparación, el fármaco estándar mostró un alto porcentaje de inhibición del 96.78% a 1000 µg/ml y del 31.14% a 100 µg/ml. Estos resultados sugieren que el extracto de cáscara de piña posee propiedades antiinflamatorias, como consecuencia del alto contenido de TFC en el extracto (**Ajagun-Ogunleye & Ebuehi, 2020**).

La desnaturalización de la albúmina del huevo es un proceso en el cual la proteína pierde su estructura tridimensional nativa y, por lo tanto, sus propiedades biológicas. Esto debido a la ruptura de los enlaces débiles que mantienen la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína, como los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas (**Qamar et al., 2021**). **N'guessan et al., (2021)**, indica que los compuestos fenólicos y flavonoides, entre otros compuestos, tienen la capacidad de reducir los impactos de desnaturalización generados por situaciones de estrés. Lo que concuerda con la premisa de que el extracto etanólico de la cáscara de piña cuenta con un efecto antiinflamatorio de interés industrial.

Por otro lado, **Mohd Ali et al., (2020)**, obtuvo un porcentaje de inhibición del 75%, procedente de un extracto del tallo y pulpa de la piña, valor similar al obtenido con el extracto solo de la cáscara. Lo que respalda la idea de que la cáscara, que a menudo es considerada como un residuo de poco valor, puede tener aplicaciones potenciales en la salud, ofreciendo una fuente adicional de compuestos beneficiosos para la salud.

3.1.4. Determinación de la vida útil del extracto

Para la determinación de la vida útil del extracto se consideraron varios factores, entre estos, el pH, la humedad, la variación del contenido total de fenoles y flavonoides y sus actividades biológicas. Estas evaluaciones se llevaron a cabo de manera periódica durante un mes aproximadamente. La utilización del software MiniTab, con un paquete estadístico especializado en estudios de estabilidad, facilitó la predicción del tiempo de vida útil del extracto.

3.1.4.1. Análisis de la estabilidad del extracto en función del pH

El análisis de pH del extracto, realizado cada 4 días durante un mes, pronostica un tiempo de vida útil de aproximadamente 60 días (**figura 3**). Los límites se establecieron en base a la información presentada por **Hamoudi et al., (2021)**, donde se indica que los compuestos fenólicos son más estables en un entorno ácido, y pueden experimentar ciertos cambios en su estructura y actividad en condiciones más alcalinas ($\text{pH} > 6$).

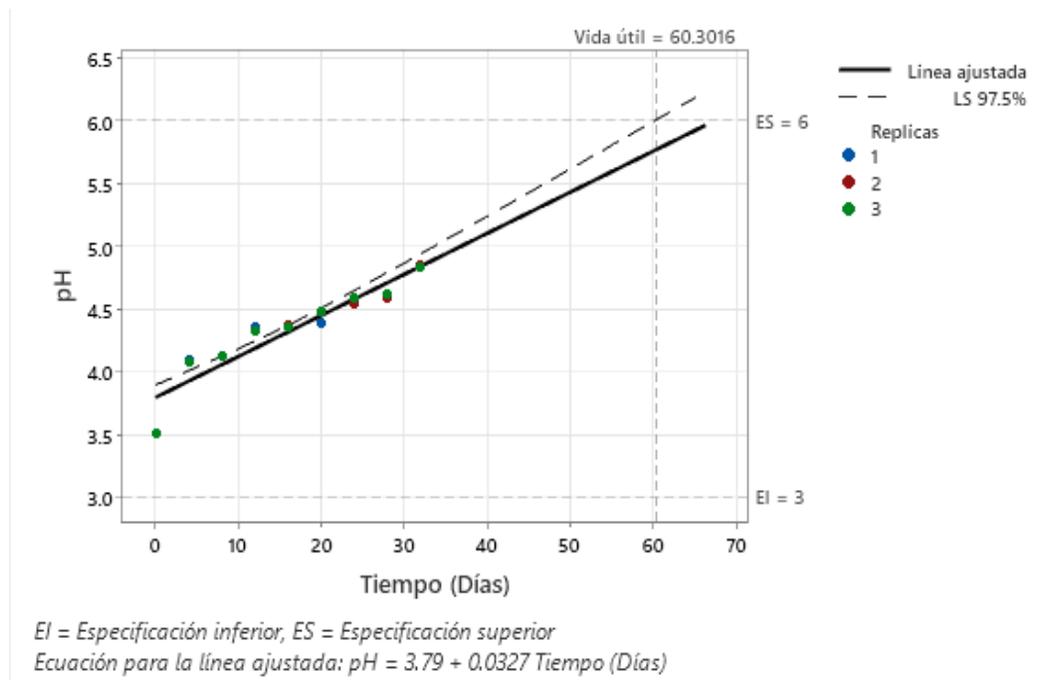


Figura 3. Pronóstico de la vida útil del extracto de cáscara de piña en función de la variación del pH durante 30 días aproximadamente.

Con un nivel de confianza del 95%, se espera que al menos el 50% de las respuestas del pH del extracto se mantengan dentro del rango aceptable durante ese período de tiempo.

La variación observada en los valores de pH a lo largo del tiempo puede atribuirse a diversas interacciones entre los componentes del extracto y factores ambientales, a pesar de las condiciones adecuadas de almacenamiento. La variación del pH entre el tiempo 0 y los primeros 4 días podría ser resultado de procesos metabólicos residuales o reacciones de hidrólisis (Prieto Lage et al., 2023). Posteriormente, la estabilización en un rango de 4.09 a 4.83 indica un equilibrio en las interacciones ácido-base, posiblemente vinculado a la naturaleza de los compuestos presentes en el extracto y su comportamiento en el tiempo (Macharia et al., 2023).

3.1.4.2. Análisis de la estabilidad del extracto en función de la humedad

El análisis de humedad del extracto, evaluado cada 4 días durante un mes, pronostica un tiempo de vida útil de aproximadamente 40 días (**figura 4**). Los límites establecidos para el cálculo de la vida útil se seleccionaron en función de estudios realizados por **Ferreira et al., (2020)**, donde se menciona que un extracto con un porcentaje de un humedad reducido tiene a perder sus actividades biológicas rápidamente.

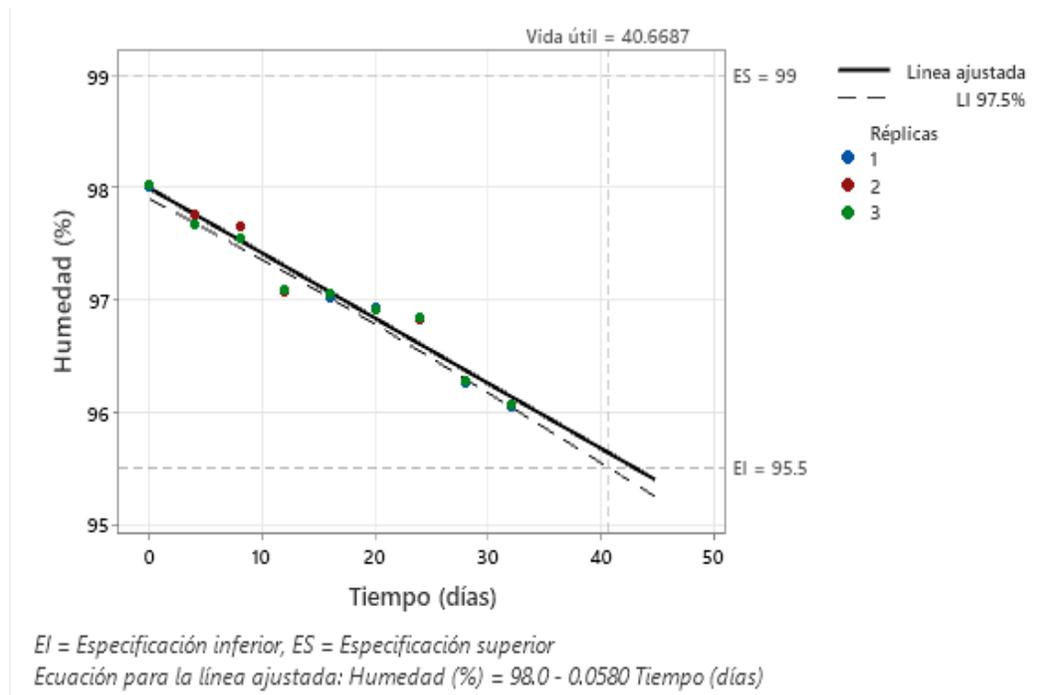


Figura 4. Pronóstico de la vida útil del extracto de cáscara de piña en función de la variación de la humedad.

Con un nivel de confianza del 95%, se espera que al menos el 50% de las respuestas de los valores de humedad del extracto se mantengan dentro del rango aceptable durante ese período de tiempo.

El porcentaje de humedad del tiempo 0 del extracto, indica la eficiencia de extracción aplicando las condiciones establecidas en el tratamiento 1 (**tabla 1**). Sin embargo, la disminución gradual de la humedad a lo largo del estudio puede atribuirse a procesos de deshidratación natural, a pesar de que las condiciones de almacenamiento se optimizaron al utilizar frascos ámbar, tapas herméticas y refrigeración. Además, la pérdida de humedad podría deberse también a factores como la permeabilidad del envase, las condiciones ambientales y la duración del almacenamiento (**Bansod et al., 2023**). **Macharia et al., (2023)**, resalta la importancia del papel que desempeña este parámetro en la estabilidad y calidad de los extractos, ya que puede afectar la estructura molecular de los compuestos presentes. Si la humedad disminuye por debajo del límite establecido, existe el riesgo de comprometer la integridad de los compuestos bioactivos, sus propiedades y, por ende, su eficacia (Sehaki et al., 2023).

3.1.4.3. Análisis de la estabilidad del contenido total de polifenoles y flavonoides

El análisis de estabilidad en función del contenido total de fenoles del extracto, evaluado cada 4 días durante un mes, pronostica un tiempo de vida útil de aproximadamente 77 días (**figura 5**). Los límites para el cálculo de la vida útil se establecieron tomando en cuenta que una concentración demasiado baja de polifenoles no representa actividades biológicas de utilidad (límite inferior 30 mg GAE/ g DW) y el límite superior (90 mg GAE/g DW), se seleccionó tomando en cuenta la presencia de otros metabolitos presentes en el extracto (**Lourenço et al., 2021**).

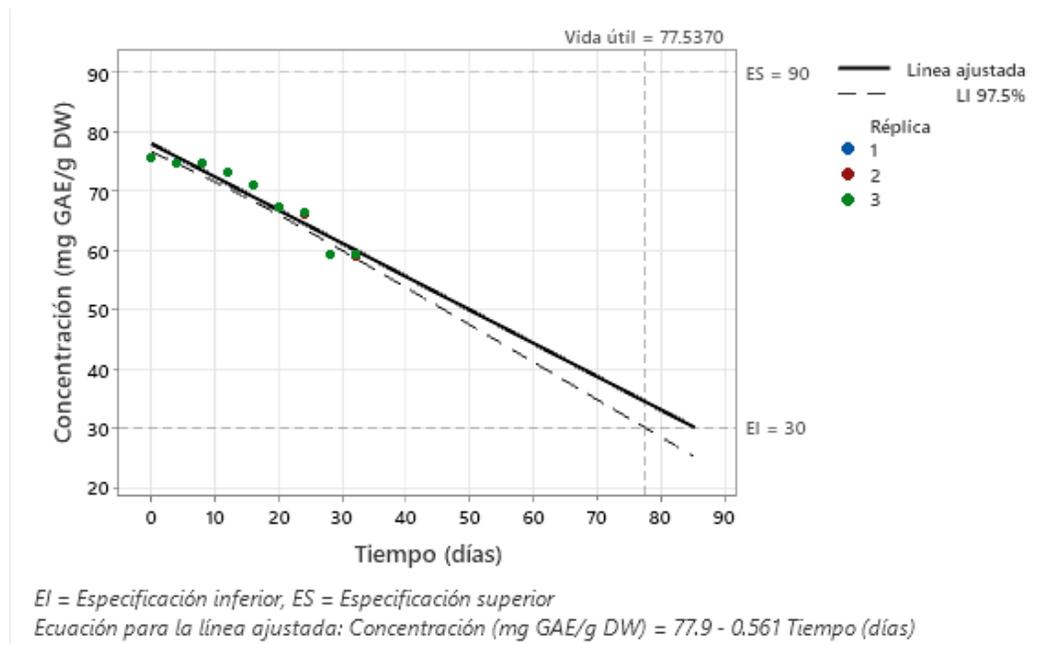


Figura 5. Pronóstico de la vida útil del contenido total de compuestos fenólicos presentes en el extracto.

Con un nivel de confianza del 95%, se espera que al menos el 50% de las respuestas de los valores de humedad del extracto se mantengan dentro del rango aceptable durante ese período de tiempo.

En base al análisis realizado, se observa que la concentración de polifenoles experimenta una disminución progresiva a lo largo del tiempo. La mayor baja se registra entre los primeros 8 y 12 días, período en el cual la concentración disminuye de manera más pronunciada, a pesar de que las condiciones de almacenamiento fueron óptimas. Lo que confirma la información presentada por **Trujillo, (2021)**, donde se menciona que las interacciones químicas pueden ocurrir incluso en ambientes cerrados debido a la complejidad de los componentes presentes en un extracto y a la posible presencia de factores endógenos que podrían catalizar ciertas reacciones.

Por otro lado, si la concentración de polifenoles disminuyera por debajo del límite inferior establecido (30 mg GAE/g DW), podría comprometer la actividad biológica y utilidad del extracto. Se debe considerar que la variación del pH y la humedad también pueden influir en la estabilidad de los polifenoles (**Pandey et al., 2016**). **Lourenço et al., (2020)**, en su estudio de estabilidad presentó un tiempo de vida útil de 98 días aproximadamente para el microencapsulado de un extracto procedente de la piña, no específicamente de residuos. Valores similares a los obtenidos en el presente estudio tomando en cuenta el tipo de material utilizado.

De igual forma, el análisis de estabilidad en función del contenido total de flavonoides del extracto, evaluado cada 4 días durante un mes, pronostica un tiempo de vida útil de aproximadamente 43 días (**figura 6**). Para la determinación de los límites (inferior 5 mg QE/ g DW y superior 40 mg QE/g DW), se utilizó el mismo análisis aplicado para el caso de los fenoles, tomando en cuenta que la cantidad de flavonoides es menor debido la presencia de otros compuestos (**Lourenço et al., 2021**).

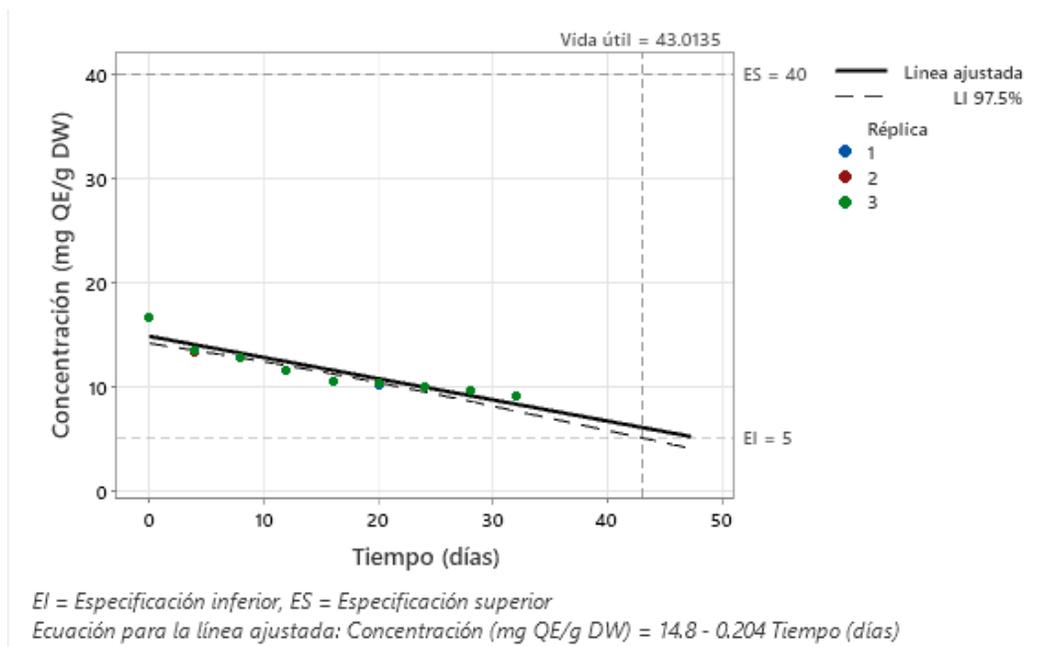


Figura 6. Pronóstico de la vida útil del contenido total de flavonoides presentes en el extracto.

Con un nivel de confianza del 95%, se espera que al menos el 50% de las respuestas de los valores de humedad del extracto se mantengan dentro del rango aceptable durante ese período de tiempo.

Se observa una disminución marcada en la concentración de flavonoides durante los primeros 4 días, pasando de un valor inicial promedio de 16.67 mg QE/g DW a alrededor de 13.375 mg QE/g DW. Esta rápida disminución podría deberse a procesos de degradación acelerada o interacciones químicas complejas (Do et al., 2014). Si la concentración de flavonoides sigue disminuyendo y cae por debajo del límite inferior establecido (5 mg QE/g DW), podría comprometer la efectividad del extracto en términos de las actividades biológicas con las que contribuyen. La variación en los valores de pH y humedad podría estar asociada con esta

disminución, ya que condiciones subóptimas pueden acelerar procesos de degradación (Orsat & Routray, 2017; Serafini et al., 2010).

La diferencia en la vida útil y concentración entre los flavonoides y los polifenoles puede atribuirse a la mayor susceptibilidad de los flavonoides a procesos de degradación debido a su estructura química más compleja, que incluye anillos aromáticos y grupos hidroxilo que son más propensos a reacciones de oxidación y otros cambios estructurales con el tiempo (Hossain & Rahman, 2011). En contraste con un estudio presentado por Khedkar et al., (2017), se indica que el tiempo de vida útil estimado para los extractos finales se encuentra en un rango de 52 – 63 días, en base al método de extracción utilizado. Además, menciona que los polifenoles debido a su estructura más simple presentan una mayor resistencia a procesos de degradación.

3.1.4.4. Análisis de estabilidad de la actividad antioxidante y el efecto antiinflamatorio

El análisis de estabilidad en función de la actividad antioxidante del extracto, evaluado cada 15 días durante un mes, pronostica un tiempo de vida útil de aproximadamente 59 días (figura 7). En base a la información mencionada por Gulcin, (2020), se fijó un límite inferior del 30% para evitar que la actividad antioxidante sea demasiado baja, ya que esto limitaría su utilidad en diversas aplicaciones. Además, sugiere que el límite superior se fijó en un 90%, reconociendo que aunque los polifenoles y flavonoides contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante, hay otros compuestos presentes que ocupan el porcentaje restante.

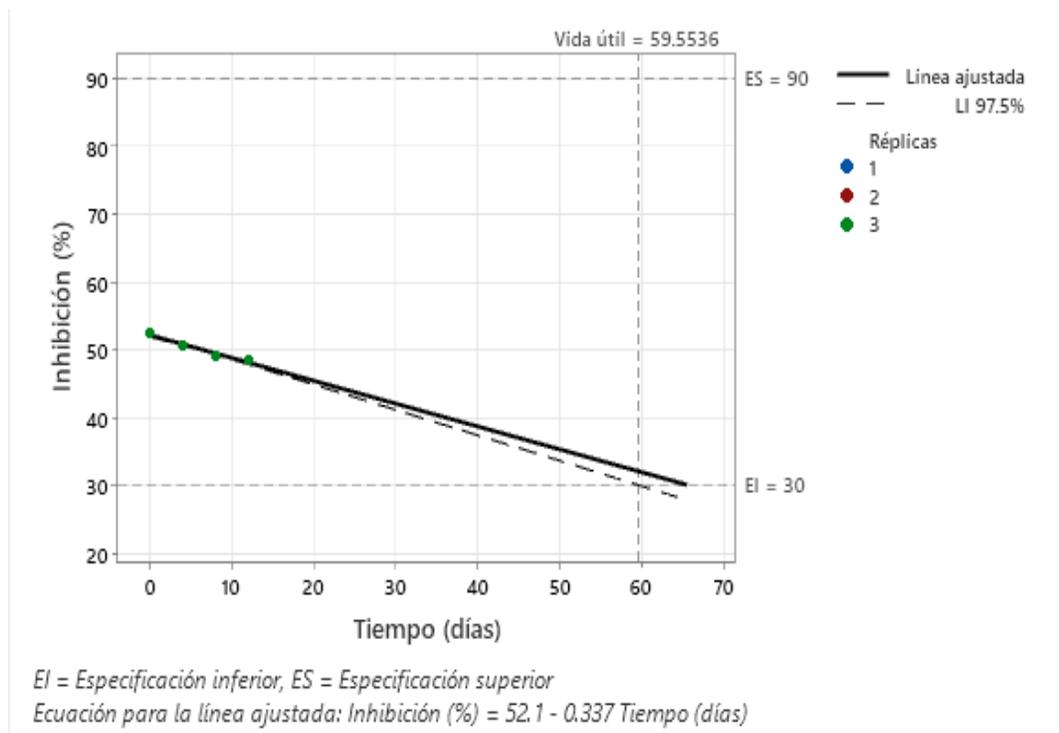


Figura 7. Determinación de la vida útil de la actividad antioxidante del extracto.

Con un nivel de confianza del 95%, se espera que al menos el 50% de las respuestas de los valores de humedad del extracto se mantengan dentro del rango aceptable durante ese período de tiempo.

La disminución de la actividad antioxidante del extracto de cáscara de piña a lo largo del tiempo, puede atribuirse a diversos factores. Entre estos, la temperatura y la exposición al oxígeno, así como cambios químicos naturales en el extracto (Wang et al., 2021). En este contexto, es importante mencionar que los polifenoles, al tener una vida útil más extensa, podrían ser los principales contribuyentes a la actividad antioxidante del extracto. Esta correlación sugiere que la desestabilización de los polifenoles podría ser un factor determinante en la disminución de la actividad antioxidante observada con el tiempo. Información similar a la presentada por Deng et al., (2021), donde se indica que los flavonoides,

aunque también relevantes para la capacidad antioxidante, podrían tener una influencia menor en esta disminución, ya que su tiempo de estabilidad es ligeramente inferior.

Factores ambientales y procesos químicos naturales durante el almacenamiento podrían afectar la integridad de los polifenoles, comprometiendo su capacidad antioxidante y, por ende, la eficacia del extracto en aplicaciones industriales y de salud (**Lourenço et al., 2021**). Sin embargo, **Prieto Lage et al., (2023)**, en su investigación presentó un tiempo de estabilidad de estos metabolitos de 100 días para extractos con actividad antioxidante procedentes de otras fuentes naturales, lo que implica que la estabilidad depende fuertemente del material vegetal y procedimiento de extracción de los metabolitos.

Por otro lado, el análisis de estabilidad en función del efecto antiinflamatorio del extracto, evaluado cada 15 días durante un mes, pronostica un tiempo de vida útil de aproximadamente 37 días (**figura 8**). Los límites establecidos para el cálculo de la vida útil fueron de un 20% de inhibición a un 95%, mismos que se establecieron en función de los requerimientos mínimos para ser considerado un extracto con aplicabilidad significativa (**da Costa et al., 2015**).

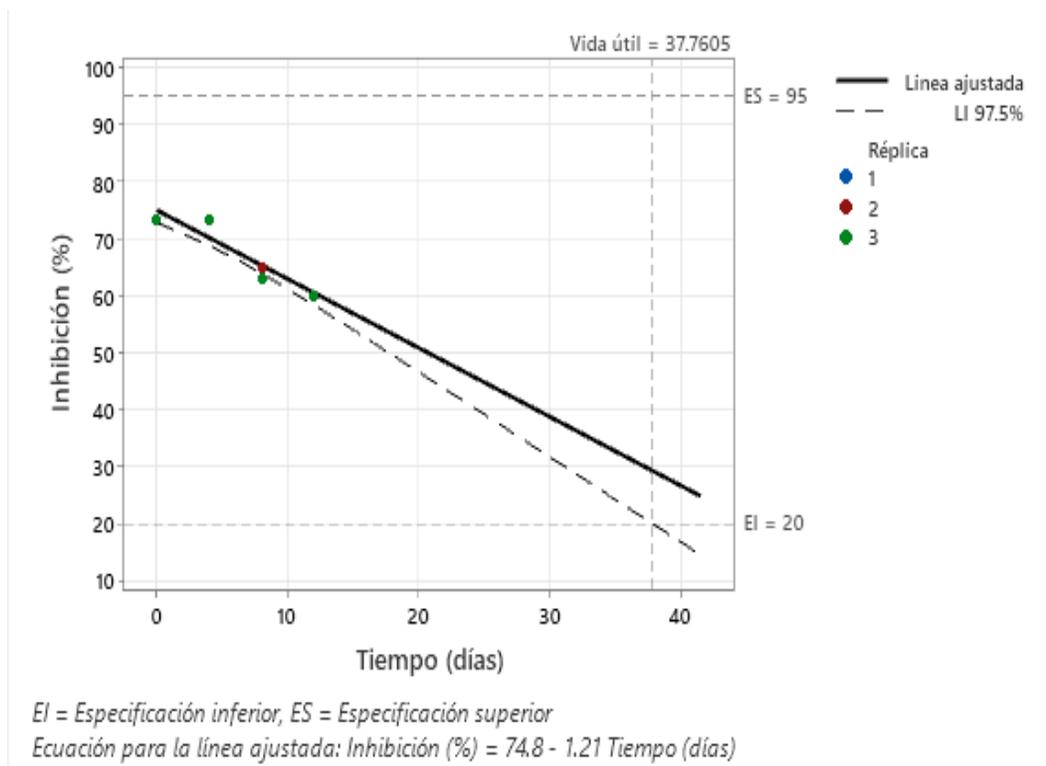


Figura 8. Determinación de la vida útil en base al efecto antiinflamatorio del extracto.

Con un nivel de confianza del 95%, se espera que al menos el 50% de las respuestas de los valores de humedad del extracto se mantengan dentro del rango aceptable durante ese período de tiempo.

Se observó una marcada disminución en el porcentaje de inhibición entre los días 8 y 12, donde se registraron valores de 64.91%, 63.01%, y 59.95% respectivamente. Esta reducción podría estar asociada a cambios en la composición química del extracto y con el tiempo, afectar su capacidad para modular procesos inflamatorios (Serafini et al., 2010).

En este caso, el tiempo de vida útil pronosticado es similar a los valores presentados por **Ajayi et al., (2022)**, donde indica que el tiempo de estabilidad del efecto antiinflamatorio de extractos procedentes de diferentes parte de la piña es de 40 días, además, hace énfasis en la relación de dicha actividad biológica con la concentración de flavonoides. En caso de que el porcentaje de inhibición del efecto antiinflamatorio caiga por debajo del límite establecido (20%), esto podría indicar una pérdida de potencia del extracto y, por ende, comprometer su utilidad terapéutica. Información que concuerda con lo mencionado por **Lourenço et al., (2021)** y **N'guessan et al., (2021)**, en sus investigaciones de optimización de extracción, microencapsulación y almacenamiento de extractos de origen natural.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La extracción de compuestos bioactivos de la cáscara de piña con etanol al 80% en una relación 1:20 demostró alta eficiencia, resultando en concentraciones de 75.59 ± 0.54 mg GAE/g DW para fenoles totales y 16.67 ± 0.29 mg QE/g DW para flavonoides totales. Además, El análisis estadístico reveló que tanto el tipo de solvente como la relación material vegetal/volumen de disolvente tienen efectos significativos sobre la concentración de fenoles totales. Confirmando que el tratamiento 1 es el más adecuado para obtener mejores resultados de TPC y TFC en la cáscara de piña.
- El extracto procedente de la cáscara de piña, demostró una destacada capacidad antioxidante, evaluada mediante el ensayo DPPH, con un $52.27 \pm 1.45\%$ de inhibición de radicales y 322.447 ± 6.34 μ mol Eq. Trolox/L. Estos resultados sugieren una relación directa entre la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides y la actividad antioxidante del extracto. La eficacia del proceso de extracción se evidenció al seleccionar el tratamiento con etanol al 80%, reforzando la influencia de la polaridad del solvente en la composición y eficacia de los metabolitos.
- El extracto etanólico obtenido a partir del tratamiento 1 con una concentración de 75.59 ± 0.54 mg GAE/g DW para fenoles totales, exhibió propiedades antiinflamatorias notables. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante la inhibición de la desnaturalización de la albúmina del huevo en concentraciones

de 100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. A 1000 $\mu\text{g/ml}$, el extracto logró una inhibición máxima del 73.15%, destacando su potencial. Comparativamente, el diclofenaco de sodio, utilizado como estándar, mostró un alto porcentaje de inhibición del 96.78% a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y del 31.14% a 100 $\mu\text{g/ml}$. La capacidad del extracto de cáscara de piña para reducir la desnaturalización de la albúmina sugiere aplicaciones potenciales en la industria alimentaria y de salud, resaltando la importancia de valorizar los residuos agroindustriales.

- La evaluación de la vida útil del extracto de cáscara de piña abordó diversos aspectos, entre estos, la concentración de polifenoles y flavonoides en la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Además, se estableció una correlación entre la estabilidad de estos compuestos y su eficacia biológica, subrayando la importancia del control de pH y humedad, factores que afectan el contenido de dichos metabolitos. En base a estas consideraciones, se estima que la vida útil del extracto se sitúa en un rango de 40 a 60 días. Sin embargo, esta cifra representa solo un promedio, ya que la contribución diferencial de cada parámetro y las interacciones entre ellos pueden influir en la estabilidad general del extracto.

4.2. Recomendaciones

- Aplicar métodos no convencionales de extracción de compuestos bioactivos, con el fin de incrementar la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto y por ende mejorar la eficacia sus actividades biológicas.
- Evaluar las potenciales actividades biológicas del extracto aplicando métodos in vivo para constatar los resultados obtenidos.
- Mejorar las condiciones de almacenamiento del extracto durante el tiempo de estudio de estabilidad, enfocándose principalmente en mantener la humedad del extracto a lo largo del tiempo.
- Incluir análisis microbiológicos en el estudio de estabilidad con el fin identificar otros posibles factores que podría influir en el pronóstico de la vida útil del extracto.

MATERIAL DE REFERENCIA

- Ahmad, N., Qamar, M., Yuan, Y., Nazir, Y., Wilairatana, P., & Mubarak, M. S. (2022). Dietary Polyphenols: Extraction, Identification, Bioavailability, and Role for Prevention and Treatment of Colorectal and Prostate Cancers. *Molecules*, 27(9), 2831. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27092831>
- Aili Hamzah, A. F., Hamzah, M. H., Che Man, H., Jamali, N. S., Siajam, S. I., & Ismail, M. H. (2021). Recent Updates on the Conversion of Pineapple Waste (*Ananas comosus*) to Value-Added Products, Future Perspectives and Challenges. *Agronomy*, 11(11), 2221. Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11112221>
- Ajagun-Ogunleye, M. O., & Ebuehi, O. A. T. (2020). Evaluation of the anti-aging and antioxidant action of *Ananas sativa* and *Moringa oleifera* in a fruit fly model organism. *Journal of Food Biochemistry*, 44(11). Doi: <https://doi.org/10.1111/JFBC.13426>
- Ajayi, A. M., Coker, A. I., Oyebanjo, O. T., Adebajo, I. M., & Ademowo, O. G. (2022). *Ananas comosus* (L) Merrill (pineapple) fruit peel extract demonstrates antimalarial, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114576. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114576>
- Anbesaw, M. S. (2021). Characterization and Potential Application of Bromelain from Pineapple (*Ananas comosus*) Waste (Peel) in Recovery of Silver from X-Ray Films. *International Journal of Biomaterials*, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9964337>
- Ávila, M. L., Coop-Gamas, F., Cervantes-Rodríguez, M., Méndez-Iturbide, D., & Aranda-González, I. I. (2020). The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases—Clinically controlled trials. In *Journal of Food Biochemistry* (Vol. 44, Issue 5). Blackwell Publishing Ltd. Doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13191>

- Azevedo, A., Gominho, J., & Duarte, E. (2021). Performance of Anaerobic Co-digestion of Pig Slurry with Pineapple (*Ananas comosus*) Bio-waste Residues. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 303–311. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00959-w>
- Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., & Arora, A. (2018). Valorization of pineapple wastes for food and therapeutic applications. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 60–70. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.09.024>
- Bansod, S. P., Parikh, J. K., & Sarangi, P. K. (2023a). Pineapple peel waste valorization for extraction of bio-active compounds and protein: Microwave assisted method and Box Behnken design optimization. *Environmental Research*, 221, 115237. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.115237>
- Bobo, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Brainina, K., Stozhko, N., Bukharinova, M., Khamzina, E., & Vidrevich, M. (2019). Potentiometric method of plant microsuspensions antioxidant activity determination. *Food Chemistry*, 278, 653–658. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.11.098>
- Campos, D. A., Ribeiro, T. B., Teixeira, J. A., Pastrana, L., & Pintado, M. M. (2020). Integral Valorization of Pineapple (*Ananas comosus* L.) By-Products through a Green Chemistry Approach towards Added Value Ingredients. *Foods*, 9(1), 60. <https://doi.org/10.3390/foods9010060>
- Carsono, N., Tumilaar, S. G., Kurnia, D., Latipudin, D., & Satari, M. H. (2022). A Review of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Properties of Piper Species. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27196774/S1>

- Cuffaro, D., Digiacomio, M., & Macchia, M. (2023). Dietary Bioactive Compounds: Implications for Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 4966, 15(23), 4966. <https://doi.org/10.3390/NU15234966>
- da Costa, G. A. F., Morais, M. G., Saldanha, A. A., Assis Silva, I. C., Aleixo, Á. A., Ferreira, J. M. S., Soares, A. C., Duarte-Almeida, J. M., & Lima, L. A. R. D. S. (2015). Antioxidant, Antibacterial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Potential of the Leaves of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (*Solanaceae*). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 315987. <https://doi.org/10.1155/2015/315987>
- Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D. G., & Deng, W. (2021). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8852759>
- Dharmadeva, S., Galgamuwa, L., Prasadinie, C., & Kumarasinghe, N. (2018). In vitro anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa* L. bark using albumin denaturation method. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 39(4), 239. Doi: https://doi.org/10.4103/ayu.ayu_27_18
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014a). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2013.11.001>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. In *Plant Physiology* (Vol. 184, Issue 1, pp. 39–52). American Society of Plant Biologists. Doi: <https://doi.org/10.1104/PP.20.00433>

- European Medicines Agency. (2003). ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products step 5 note for guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products. <http://www.emea.eu.int>
- Ferreira, P., Zanuso, E., Genisheva, Z., Rocha, C. M. R., & Teixeira, J. A. (2020). Green and Sustainable Valorization of Bioactive Phenolic Compounds from *Pinus* By-Products. *Molecules*, 25(12), 2931. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25122931>
- George, J., Nguyen, T., Williams, D., Hardner, C., Sanewski, G., & Smyth, H. E. (2023). Review of the Aroma Chemistry of Pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(9), 4069–4082. Doi: https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C08546/SUPPL_FILE/JF2C08546_SI_001.PDF
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Hamoudi, M., Amroun, D., Boutefnouchet, S., Bensouici, C., Kaoula, S., Harzallah, D., Khennouf, S., & Dahamna, S. (2021). Phytochemical Screening, In vitro Antioxidant and Enzyme Inhibitory Properties, and Acute Toxicity of Extracts from the Aerial Parts of *Ephedra nebrodensis*, a Source of Bioactive Compounds. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 25(6), 1058–1071. Doi: <https://doi.org/10.2174/1386207324666210303094339>
- Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A. L., Lizardi-Jiménez, M. A., Pech-Cohuo, S., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J. C., García-Cruz, U., & Pacheco, N. (2021). Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105658. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105658>

- Hossain, M. A., & Rahman, S. M. M. (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 44(3), 672–676. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.11.036>
- Ji, M., Gong, X., Li, X., Wang, C., & Li, M. (2020). Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from *Hippophae* Species—A Review. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 917, 25(4), 917. Doi: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25040917>
- Khedkar, M. A., Nimbalkar, P. R., Gaikwad, S. G., Chavan, P. V., & Bankar, S. B. (2017). Sustainable biobutanol production from pineapple waste by using *Clostridium acetobutylicum* B 527: Drying kinetics study. *Bioresource Technology*, 225, 359–366. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.11.058>
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Swierczek-Zieba, G. (2013). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(1), 78–101. Doi: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19010078>
- Lourenço, S. C., Campos, D. A., Gómez-García, R., Pintado, M., Oliveira, M. C., Santos, D. I., Corrêa-Filho, L. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2021). Optimization of Natural Antioxidants Extraction from Pineapple Peel and Their Stabilization by Spray Drying. *Foods*, 10(6), 1255. Doi: <https://doi.org/10.3390/foods10061255>
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2020). Microencapsulation of Pineapple Peel Extract by Spray Drying Using Maltodextrin, Inulin, and Arabic Gum as Wall Matrices. *Foods*, 9(6), 718. Doi: <https://doi.org/10.3390/foods9060718>
- Macharia, J. M., Mwangi, R. W., Szabó, I., Zand, A., Kaposztas, Z., Varjas, T., Rozmann, N., & Raposa, B. L. (2023). Regulatory activities of *Warbugia*

ugandensis ethanolic extracts on colorectal cancer-specific genome expression dose-dependently. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 166. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115325>

Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125124>

Meena, L., Sengar, A. S., Neog, R., & Sunil, C. K. (2022). Pineapple processing waste (PPW): bioactive compounds, their extraction, and utilization: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 59(11), 4152–4164. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05271-6>

Mendonça, J. da S., Guimarães, R. de C. A., Zorretto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. Pietro, Marcelino, G., Bogó, D., Freitas, K. de C., Hiane, P. A., de Pádua Melo, E. S., Vilela, M. L. B., & Nascimento, V. A. do. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*, 27(11), 3563. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>

Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., & Lasekan, O. (2020). Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, 137, 109675. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109675>

Morais, M. G., Saldanha, A. A., Azevedo, L. S., Mendes, I. C., Rodrigues, J. P. C., Amado, P. A., Farias, K. de S., Zanuncio, V. S. S., Cassemiro, N. S., Silva, D. B. da, Soares, A. C., & Lima, L. A. R. dos S. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory effects of fractions from ripe fruits of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (*Solanaceae*) and putative identification of bioactive compounds by GC-MS and LC-DAD-MS. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 156. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111145>

- Nath, P. C., Ojha, A., Debnath, S., Neetu, K., Bardhan, S., Mitra, P., Sharma, M., Sridhar, K., & Nayak, P. K. (2023). Recent advances in valorization of pineapple (*Ananas comosus*) processing waste and by-products: A step towards circular bioeconomy. *Trends in Food Science & Technology*, 136, 100–111. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.04.008>
- N'guessan, B. B., Asiamah, A. D., Arthur, N. K., Frimpong-Manso, S., Amoateng, P., Amponsah, S. K., Kukuia, K. E., Sarkodie, J. A., Opuni, K. F.-M., Asiedu-Gyekye, I. J., & Appiah-Opong, R. (2021). Ethanolic extract of *Nymphaea lotus* L. (*Nymphaeaceae*) leaves exhibits in vitro antioxidant, in vivo anti-inflammatory and cytotoxic activities on Jurkat and MCF-7 cancer cell lines. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 22. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03195-w>
- Noui, A., Boudiar, T., Boulebd, H., Gali, L., del Mar Contreras, M., Segura-Carretero, A., Nieto, G., & Akkal, S. (2022). HPLC-DAD-ESI/MS profiles of bioactive compounds, antioxidant, and anticholinesterase activities of *Ephedra alata* subsp. *alenda* growing in Algeria. *Natural Product Research*, 36(22), 5910–5915. Doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2024184>
- Orsat, V., & Routray, W. (2017). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids. *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*, 221–244. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00008-5>
- Pandey, M. M., Khaton, S., Rastogi, S., & Rawat, A. K. S. (2016). Determination of flavonoids, polyphenols, and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. *Journal of Integrative Medicine*, 14(6), 447–455. Doi: [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(16\)60276-5](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(16)60276-5)
- Pitts, R., Gribov, Y., Coburn, J., -, al, Wulfmeier, H., Albrecht, D., Fischer, J., Putu Ermi Hikmawanti, N., Fatmawati, S., & Wulan Asri, A. (2021). The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conference Series*:

Earth and Environmental Science, 755(1), 012060. Doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012060>

Prieto Lage, Á., Napolitano, A., & Aubourg, S. P. (2023). Enhancement of Lipid Stability and Acceptability of Canned Seafood by Addition of Natural Antioxidant Compounds to the Packing Medium—A Review. *Antioxidants* 2023, Vol. 12, Page 245, 12(2), 245. Doi: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12020245>

Putnoky, S., Caunii, A., & Butnariu, M. (2013). Study on the stability and antioxidant effect of the *Allium ursinum* watery extract. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 21. Doi: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-21>

Qamar, M., Akhtar, S., Ismail, T., Yuan, Y., Ahmad, N., Tawab, A., Ismail, A., Barnard, R. T., Cooper, M. A., Blaskovich, M. A. T., & Ziora, Z. M. (2021). *Syzygium cumini*(L.) Skeels fruit extracts: In vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, 113805. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.113805>

Roohinejad, S., Nikmaram, N., Brahim, M., Koubaa, M., Khelfa, A., & Greiner, R. (2017). Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*, 399–419. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00016-4>

Sarangi, P. K., Anand Singh, T., Joykumar Singh, N., Prasad Shadangi, K., Srivastava, R. K., Singh, A. K., Chandel, A. K., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2022). Sustainable utilization of pineapple wastes for production of bioenergy, biochemicals and value-added products: A review. *Bioresource Technology*, 351, 127085. Doi: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.127085>

Sasikumar, J. M., Erba, O., & Egigu, M. C. (2020). In vitro antioxidant activity and polyphenolic content of commonly used spices from *Ethiopia*. *Heliyon*, 6(9), e05027. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05027>

- Sehaki, C., Jullian, N., Ayati, F., Fernane, F., & Gontier, E. (2023). A Review of *Pistacia lentiscus* Polyphenols: Chemical Diversity and Pharmacological Activities. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 279, 12(2), 279. Doi: <https://doi.org/10.3390/PLANTS12020279>
- Serafini, M., Peluso, I., & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 273–278. <https://doi.org/DOI:10.1017/S002966511000162X>
- Trujillo, J. (2021). Evaluación de la capacidad antioxidante de la extractos de la cáscara de piña (*Ananas comosus*), frente a un producto comercial. Universidad Politécnica Salesiana.
- Wang, Y., Ouyang, F., Teng, C., & Qu, J. (2021). Optimization for the extraction of polyphenols from *Inonotus obliquus* and its antioxidation activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(9), 852–859. Doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1864642>
- Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2018). Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1260–1270. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>
- Zwingelstein, M., Draye, M., Besombes, J.-L., Piot, C., & Chatel, G. (2020). Viticultural wood waste as a source of polyphenols of interest: Opportunities and perspectives through conventional and emerging extraction methods. *Waste Management*, 102, 782–794. Doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.11.034>

ANEXOS

ANEXO A. Curvas de calibración para la caracterización de extractos.

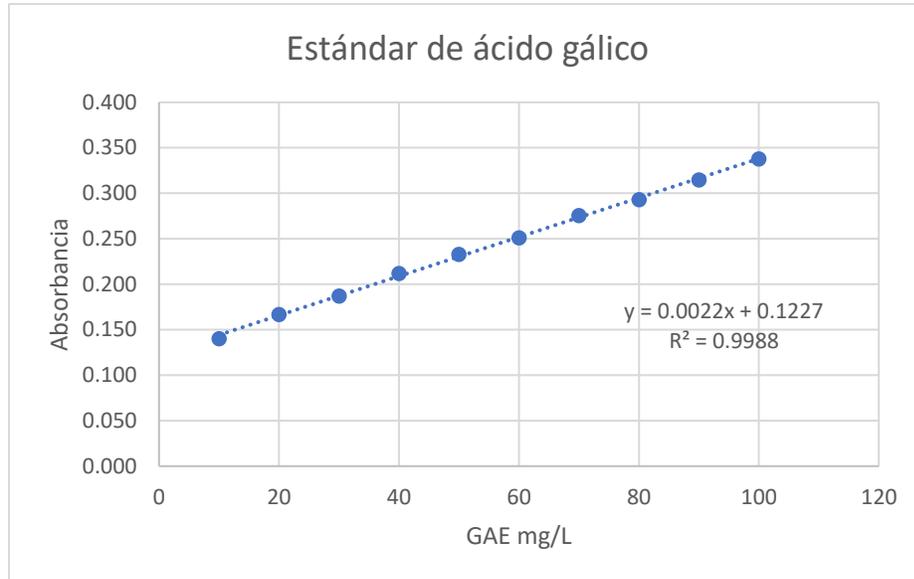


Figura 9. A: Estándar de ácido gálico (GAE) utilizado para la cuantificación de fenoles totales.

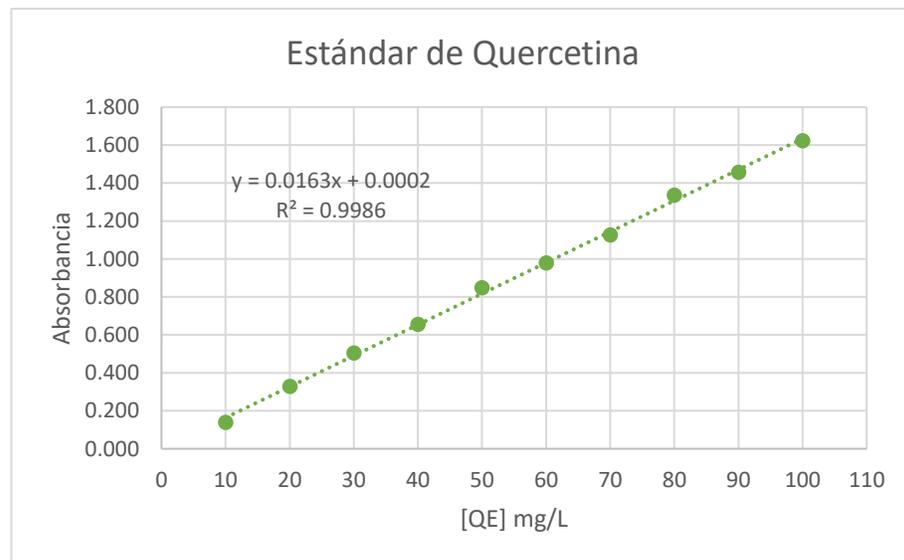


Figura 10.A: Estándar de quercetina (QE) utilizado para la cuantificación de flavonoides totales.

ANEXO B. Análisis estadístico para la determinación del extracto con mayor contenido de fenoles totales

Tabla 5. B: Análisis ANOVA para el contenido de fenoles totales presentes en el extracto procedente de la cáscara de piña.

Pruebas De Efectos Inter-Sujetos					
Variable Dependiente:	Concentración				
Origen	Tipo Iii De Suma De Cuadrados	G1	Media Cuadrática	F	Sig.
Modelo Corregido	1014.833 ^a	3	338.278	22.336	0.000
Intersección	21934.444	1	21934.444	1448.300	0.000
Disolvente	405.673	1	405.673	26.786	0.001
Relación	248.532	1	248.532	16.410	0.001
Disolvente * Relación	360.628	1	360.628	23.812	0.001
Error	121.160	8	15.145		
Total	23070.436	12			
Total Corregido	1135.993	11			

A. R Al Cuadrado = .893 (R Al Cuadrado Ajustada = .853)

ANEXO C. Fotografías



Figura 11.C: Secado del material vegetal utilizando un deshidratador por convección.



Figura 12.C: Pesado de material vegetal: Cascara de piña (*Ananas comosus*).



Figura 13.C: Extracción de los compuestos bioactivos utilizando Etanol al 80% durante 30 minutos a 50 °C.



Figura 14.C: Placa de 96 pocillos: Determinación de flavonoides totales del extracto con mayor concentración de polifenoles.

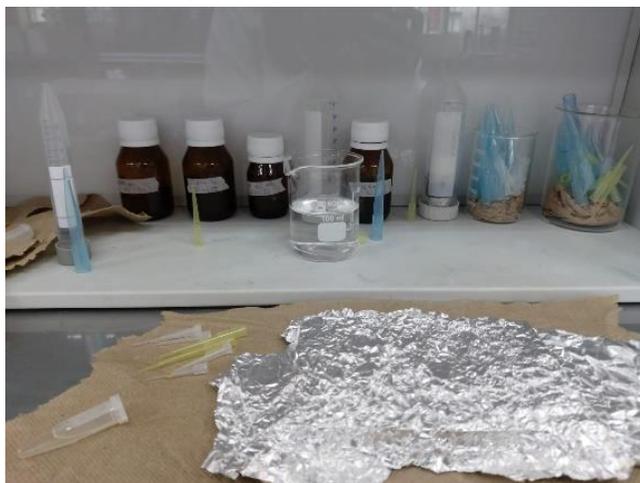


Figura 15.C: Análisis de compuestos fenólicos y flavonoides totales.

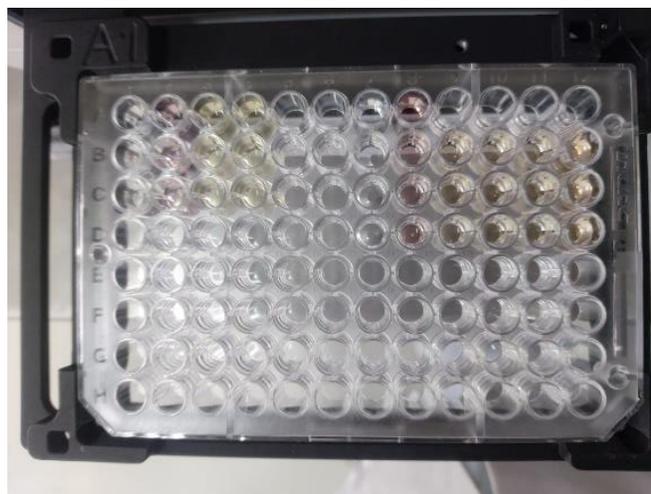


Figura 16.C: Determinación de la actividad antioxidante de cada uno de los tratamientos aplicados.



Figura 17. C: *Evaluación de la actividad antiinflamatoria.*



Figura 18.C: Desnaturalización de proteínas de la albúmina de huevo para la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto.



Figura 19.C: Determinación del porcentaje de humedad como parte del estudio de estabilidad.



Figura 20.C: Elaboración de placas para la determinación de fenoles y flavonoides totales.