UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la actividad antioxidante y el tiempo de vida útil de un extracto obtenido a partir de la mora *(Rubus glaucus)*

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

Autor: Evelyn Johanna Culqui Arcos

Tutor: Mg. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Febrero - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Danae 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, 17 de enero de 2025

Firmado electrónicamente por:
DANAE FERNANDEZ RIVERO

Mg. Danae Fernández Rivero

1757181209

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Evelyn Johanna Culqui Arcos, 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.



Evelyn Johanna Culqui Arcos

1850090422

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso 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.



Evelyn Johanna Culqui Arcos

1850090422

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 Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LILIANA PATRICIA ACURIO ARCOS

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MARIO DANIEL GARCIA SOLIS

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

Firmado electrónicamente por:
PABLO VINICIO TUZA ALVARADO

Dr. Pablo Vinicio Tuza Alvarado

1104063241

Ambato, 31 de enero de 2025

DEDICATORIA

"Para los que creyeron en mí incluso cuando dudé de mí mismo, y me recordaron que cada pequeño paso cuenta en el camino hacia grandes metas"

*Este logro se lo dedico eternamente a **Dios**, por haberme dado la vida, acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi luz en mi camino y por darme la sabiduría, fortaleza para alcanzar mis objetivos.*

*Para mi madre **Marina**, pues sin ella no lo habría logrado. Por ser mi guía, mi apoyo y por enseñarme que los sueños se construyen con esfuerzo y dedicación. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien.*

*A mi padre **Patricio**, por su amor, quien jamás se rindió y siempre luchó por verme alcanzar este logro.*

*A mis hermanas **Mayra** y **Patricia**, por enseñarme el verdadero significado de la unión y el amor fraternal, por ser mi apoyo incondicional, mi fuente constante de alegría y alentarme en cada desafío.*

Todo lo que soy y todo lo que tengo es gracias a ustedes

*Con amor **Evelyn***

AGRADECIMIENTO

*A **Dios,** por permitirme culminar una de las etapas más importantes de mi vida.*

*A mis dos grandes pilares, mis padres **Marina** y **Patricio**, gracias por su amor, sacrificio y apoyo incondicional. A lo largo de mi vida, me han dado todo, incluso cuando se sacrificaron para sí mismos. Son mi mayor orgullo, les debo no solo mi educación, sino también los valores y la fortaleza que me han guiado hasta el momento.*

*A mis queridas hermanas **Mayra** y **Patricia,** gracias por su amor, consejos y apoyo. Cada palabra de aliento, cada risa compartida han sido mi motor en los momentos más difíciles. Ustedes no solo han sido mi refugio en las tormentas, sino también mi inspiración para seguir adelante. Los quiero con todo mi corazón. A mi cuñado **Paúl** que desde que llegó a la familia, se ha convertido en un pilar de apoyo. Gracias por tu disposición para ayudar en todo momento y por demostrar siempre que el cariño es fundamental en cada relación. A mi pequeña sobrina **Aitana,** tus abrazos y tu inocencia me recordaron siempre la importancia de perseverar y disfrutar las pequeñas cosas de la vida.*

*A mi amiga y compañera de laboratorio **Emy**, cada idea, cada discusión y cada esfuerzo compartido nos permitió avanzar y aprender juntas, haciendo de esta experiencia algo mucho más valioso, hemos llegado al final de este gran desafío, gracias por todo.*

*A aquellos amigos que llegaron en el transcurso de este proceso y aún continúan a mi lado, **Yajis**, **Lenin**, **Zule** y **Cindy**. Por compartir un pedacito de su vida conmigo, gracias. Su amistad convirtió esta experiencia en un recuerdo que guardaré por siempre en mi corazón.*

*A mi tutora **Mg. Danae Fernández**, por su ayuda invaluable en la revisión de mi trabajo. Por su guía, enseñanza y consejos durante este proceso, gracias.*

Con todo mi amor y cariño

Evelyn

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
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS viii
ÍNDICE DE TABLAS xi
ÍNDICE DE FIGURAS xii
ÍNDICE DE ANEXOS xiii
RESUMEN EJECUTIVO xiv
ABSTRACT xv
CAPITULO I.-MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes investigativos 1
1.1.1. Planteamiento del problema y justificación 1
1.1.2. Antioxidantes 2
1.1.2.1. Proceso oxidativo 2
1.1.2.2. Actividad antioxidante 3
1.1.2.3. Métodos empleados para la evaluación de la actividad antioxidante 4
1.1.3. Fenoles y sus propiedades 6
1.1.4. Métodos de extracción de compuestos bioactivos 7
1.1.5. Principales características de la mora 7
1.1.5.1. Composición química de la mora 8
1.1.5.2. Producción de *Rubus glaucus* en Tungurahua 9
1.1.6. Vida útil 9
1.2. Objetivos 11
1.2.1. Objetivo general 11

1.2.2. Objetivos específicos 11
CAPITULO II.-METODOLOGÍA 12
2.1. Materiales 12
2.2. Métodos 13
2.2.1. Extracción de compuestos fenólicos procedentes de la mora utilizando un método de extracción Sólido-Líquido 13
2.2.1.1. Recolección de la materia prima 13
2.2.1.2. Preparación del material vegetal 14
2.2.1.3. Obtención del extracto vegetal 14
2.2.1.4. Planteamiento del diseño experimental 15
2.2.1.5. Determinación de la concentración de fenoles totales 15
2.2.2. Análisis de la capacidad antioxidante del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos 16
2.2.2.1. Preparación del ensayo para evaluar la actividad antioxidante 16
2.2.2.2. Análisis de la actividad antioxidante 16
2.2.3. Estimación del tiempo de vida útil del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos 17
2.2.3.1. Determinación del pH 17
2.2.3.2. Determinación de la concentración de fenoles totales del extracto 17
2.2.3.3. Determinación de la actividad biológica del extracto 17
2.2.3.4.Determinación del tiempo de vida útil 18
CAPITULO III.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN 19
3.1. Análisis y discusión de los resultados 19
3.1.1. Extracción de compuestos fenólicos procedentes de la mora utilizando un método de extracción Sólido-Líquido 19
3.1.1.1. Análisis estadístico 21
3.1.2. Análisis de la capacidad antioxidante del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos 24
3.1.3. Estimación del tiempo de vida útil del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos 26

3.1.3.1. Determinación del pH 26
3.1.3.2. Determinación de la concentración de fenoles totales del extracto..... 28
3.1.3.3.Determinación de la actividad biológica del extracto 29
CAPITULO IV.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 33
4.1. Conclusiones 33
4.2. Recomendaciones 35
MATERIALES DE REFERENCIA 36
Referencias bibliográficas..... 36
ANEXOS 48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. 3
Tabla 2. Antioxidantes presentes de manera natural en alimentos..... 4
Tabla 3. Diferentes técnicas utilizadas para medir la actividad antioxidante. 5
Tabla 4. Compuestos fenólicos presentes en la mora de Castilla (*Rubus glaucus*)..... 8
Tabla 5. Equipos de laboratorio empleados. 12
Tabla 6. Reactivos de laboratorio empleados. 12
Tabla 7. Material fungible de laboratorio empleados. 13
Tabla 8. Parámetros cinéticos correspondientes a los distintos órdenes de reacción de degradación.. 18
Tabla 9. Cuantificación del contenido fenólico total de los extractos obtenidos a partir de la mora... 20
Tabla 10. Actividad antioxidante proveniente del extracto de mora..... 24
Tabla 11. Coeficiente de determinación de los modelos cinéticos de degradación del extracto..... 31
Tabla 12. Tiempo de estabilidad del extracto de mora correspondiente al orden 1. 32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del fenol. 6
Figura 2. Tabla de colores estándar de la mora de Castilla *(Rubus glaucus)*..... 14
Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos obtenidos en los extractos de mora en cada tratamiento. 20
Figura 4. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el contenido fenólico en los extractos de mora. 22
Figura 5. Gráfica de efectos principales para el contenido fenólico en los extractos de mora. 23
Figura 6. Comparación de medias con respecto al pH en el extracto de mora. 27
Figura 7. Pronóstico del tiempo de vida útil del extracto en relación al pH. 27
Figura 8. Comparación de medias con respecto a la concentración de compuestos fenólicos en el extracto..... 28
Figura 9. Pronóstico del tiempo de vida útil del extracto de mora en relación al contenido fenólico. 29
Figura 10. Comparación de medias con respecto a la actividad antioxidante en el extracto. 30
Figura 11. Pronóstico del tiempo de vida útil del extracto de mora en relación a la actividad antioxidante. 30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Proceso de obtención de compuestos fenólicos de la mora..... 48
Anexo 2. Placa de 96 micro pocillos en la determinación de compuestos fenólicos mediante el método Folin-Ciocalteu. 48
Anexo 3. Curva de calibración de ácido gálico (10 a 100 µL). 49
Anexo 4. Cuantificación de compuestos fenólicos en cada tratamiento por triplicado. 49
Anexo 5. Cálculo demostrativo de la cuantificación fenólica del Tratamiento 1. 50
Anexo 6. Tabla de ANOVA de la cuantificación fenólica procedente de la mora a través de un diseño 2^2. 50
Anexo 7. Placa de 96 micro pocillos en la determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH. 51
Anexo 8. Curva de calibración de Trolox (50 a 500 µmol/L). 51
Anexo 9. Cálculo demostrativo del porcentaje de inhibición del radical de DPPH. 52
Anexo 10. Determinación de la actividad antioxidante del tratamiento con mayor contenido fenólico. 52
Anexo 11. Evaluación del pH del extracto proveniente de la mora..... 52
Anexo 12. Resumen estadístico de pH en el extracto de mora durante 30 días..... 53
Anexo 13. ANOVA del pH registrado en el extracto de mora durante 30 días..... 53
Anexo 14. Resumen estadístico del contenido fenólico en el extracto de mora durante 30 días..... 53
Anexo 15. ANOVA del contenido fenólico en el extracto de mora durante 30 días..... 54
Anexo 16. Resumen estadístico de la actividad antioxidante en el extracto de mora durante 30 días. . 54
Anexo 17. ANOVA de la actividad antioxidante en el extracto de mora durante 30 días..... 54
Anexo 18. Gráficas de orden de reacción obtenido a partir de la mora..... 55

RESUMEN EJECUTIVO

En los últimos años, el interés por los productos naturales ha aumentado considerablemente, gracias a sus propiedades terapéuticas, destacando especialmente su actividad antioxidante. Entre estos productos se encuentran los extractos, que pueden obtenerse de frutos rojos. Sin embargo, para garantizar su calidad, es crucial determinar su tiempo de vida útil. Un ejemplo destacado de frutos rojos ricos en antioxidantes naturales con compuestos fenólicos, es la mora *(Rubus glaucus).* En este estudio, se obtuvieron extractos de mora mediante un diseño experimental de dos factores, en el que se evaluaron la concentración de etanol y el tiempo de extracción. El contenido fenólico se determinó utilizando el método Folin-Ciocalteu, en donde los resultados identificaron como mejor tratamiento aquel que presentó el mayor contenido fenólico, alcanzando 62,594 miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco, bajo una concentración de etanol al 50 por ciento y un tiempo de extracción de 20 minutos. Además, se evaluó su actividad antioxidante utilizando el método DPPH, obteniendo un porcentaje de inhibición del 90,544 por ciento. De igual forma, se registró un valor de 161,003 micromoles equivalentes de Trolox por gramo de peso seco. Finalmente, la estabilidad del extracto se analizó durante 30 días y se estableció mediante la herramienta estadística Minitab utilizando un nivel de confianza del 95 por ciento, un tiempo de vida útil de 33,6540 días al ser almacenado en frascos de vidrio color ámbar. Su comportamiento siguió un modelo cinético de primer orden, con una constante de velocidad de 0,0031 días.

Palabras clave: Extracto de mora, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, vida útil.

ABSTRACT

In recent years, interest in natural products has increased considerably, thanks to their therapeutic properties, especially their antioxidant activity. Among these products are extracts, which can be obtained from red fruits. However, to ensure their quality, it is crucial to determine their shelf life. An outstanding example of red fruits rich in natural antioxidants with phenolic compounds is the blackberry *(Rubus glaucus).* In this study, blackberry extracts were obtained using a two-factor experimental design, in which ethanol concentration and extraction time were evaluated. The phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, where the results identified as the best treatment the one that presented the highest phenolic content, reaching 62.594 milligram equivalents of gallic acid per gram of dry weight, under an ethanol concentration of 50 percent and an extraction time of 20 minutes. In addition, its antioxidant activity was evaluated using the DPPH method, obtaining an inhibition percentage of 90.544 percent. Similarly, a value of 161.003 equivalent micromoles of Trolox per gram of dry weight was recorded. Finally, the stability of the extract was analyzed for 30 days and a shelf life of 33.6540 days when stored in amber glass bottles was established using the Minitab statistical tool with a confidence level of 95 percent. Its behavior followed a first-order kinetic model, with a rate constant of 0.0031 days.

Key words: Blackberry extract, phenolic compounds, antioxidant activity, shelf life.

CAPITULO I.-MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Planteamiento del problema y justificación

A nivel global, las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y el cáncer representan una carga significativa para la salud pública, provocando discapacidades progresivas y una alta demanda de cuidados a largo plazo **(World Health Organization, 2019).** Este proceso está vinculado al estrés oxidativo, que daña las células nerviosas debido a la acumulación de radicales libres **(Acosta et al., 2016).** Otro proceso es la acumulación anormal de proteínas, que forman agregados tóxicos que interfieren con la función celular, lo que resalta la importancia de estrategias preventivas y terapéuticas que incluyan el desarrollo de un estilo de vida saludable, el uso de antioxidantes y tratamientos farmacológicos **(Zhao et al., 2023).**

Actualmente varios estudios han demostrado que los compuestos con actividad antioxidante ayudan a prevenir el riesgo de estas diferentes enfermedades, entre estos se encuentran antocianinas, flavonoides, lignanos y ácidos fenólicos **(Robinson et al., 2020).** Según **Amariles (2022)** menciona que, los fenoles totales poseen sensibilidad a la radiación UV, oxígeno y altas temperaturas induciendo alteración en la capacidad antioxidante, por lo que, se caracterizan por tener al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático.

Se ha verificado que hoy en día, los extractos vegetales con actividad antioxidante se utilizan para neutralizar los radicales libres y reducir el estrés oxidativo en el organismo **(Vergara et al., 2021).** Este estrés oxidativo daña componentes celulares, como las membranas, las proteínas y el ADN, lo cual conduce a la disfunción y muerte de las neuronas. Al proteger las células del daño oxidativo, los antioxidantes podrían proporcionar beneficios significativos para la salud, mejorar la función cognitiva y lograr mitigar los efectos de estas enfermedades (**Naspud-Rojas, 2018).**

Varios estudios con respecto a los frutos rojos, principalmente en la mora se ha verificado que tienen una gran cantidad de compuestos bioactivos con actividad biológica **(Guerrero, 2020).** El fruto es la única parte que se aprovecha de estos cultivos, por ello, sería de gran utilidad extraer compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, además, estos compuestos extraídos de este material vegetal son

de gran interés para las industrias alimentarias y farmacéuticas **(Samaniego et al., 2020).** Por otro lado, la información que se tiene sobre el análisis de tiempo de vida útil de un extracto procedente de la mora es limitada. Por esta razón, es necesario llevar a cabo un estudio de estabilidad del extracto, ya que, asegura la conservación de su actividad biológica y permite identificar las condiciones óptimas de almacenamiento en un tiempo determinado **(Malpica et al., 2024).**

En base a estos antecedentes mencionados, la presente investigación se enfocará en evaluar la actividad antioxidante y el tiempo de vida útil de un extracto, el cual se obtendrá a partir de la mora, con la finalidad de aprovechar la cantidad de compuestos bioactivos presentes en la misma.

1.1.2. Antioxidantes

1.1.2.1. Proceso oxidativo

El proceso de oxidación es un fenómeno adverso que altera el equilibrio entre antioxidantes prooxidantes, generando cambios funcionales en las biomoléculas. Este proceso tiene lugar en los tejidos y la sangre cuando se produce un exceso de modificaciones en las biomoléculas, provocado por los radicales libres de oxígeno **(Díaz-Hung y González, 2014).**

Los radicales libres son moléculas caracterizadas por la presencia de un electrón aislado en su última órbita, lo que las hace considerablemente inestables y reactivas. Este mecanismo es crucial para la vida, ya que interviene en la producción de energía celular **(Viada et al., 2017).** No obstante, cuando la oxidación ocurre en exceso, se genera estrés oxidativo, una condición compleja que afecta a todos los niveles biológicos **(Blair y Olivares, 2014).** El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas. En la **Tabla 1** se observa cómo el estrés oxidativo está vinculado con una variedad de enfermedades crónicas y degenerativas de alta prevalencia mundial. Por ello, el control del estrés oxidativo mediante antioxidantes naturales con compuestos bioactivos es una estrategia clave para lograr mitigar los efectos de estas enfermedades **(Singh et al., 2019).**

Tabla 1

Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Enfermedad	Descripción
Cáncer	Crecimiento descontrolado de células anormales; los radicales libres contribuyen a mutaciones y daño celular.
Enfermedades cardiovasculares	Trastornos del corazón y vasos, como aterosclerosis; los radicales libres oxidan LDL y favorecen la inflamación.
Alzheimer	Enfermedad neurodegenerativa con pérdida de memoria y acumulación de placas amiloides; agravada por el estrés oxidativo.
Enfermedades renales crónicas	Deterioro progresivo de la función renal; el estrés oxidativo daña glomérulos y túbulos renales.

Nota. Adaptado de **Martins et al. (2023).**

1.1.2.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para neutralizar los radicales, moléculas inestables que causan daño oxidativo en las células, es decir, la acción antioxidante ocurre mediante una transición redox, donde una molécula antioxidante libera un átomo de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre, los cuales aceleran la quelación de iones metálicos como Fe^{+2} y Zn^{+2} **(Gordillo et al., 2012).**

El cuerpo humano cuenta con un sistema de defensa que genera compuestos antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres. No obstante, con el envejecimiento, la producción de estos compuestos disminuye, por lo cual es un aporte fundamental en la dieta con alimentos ricos en antioxidantes **(Pacheco et al., 2020).** Sin embargo, la mayoría de los suplementos dietéticos contienen antioxidantes de origen sintético, cuya ingesta prolongada puede ser perjudicial para la salud **(Wojcik et al., 2020).**

Por esta razón, en los últimos años ha aumentado el consumo de frutos rojos y vegetales, debido a que dichos alimentos han demostrado que poseen actividad antioxidante, como se muestra en la **Tabla 2**, superando incluso a los de origen químico. Consumir alimentos ricos en antioxidantes es esencial para mantener el equilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes del cuerpo, por lo que puede favorecer a la prevención de las enfermedades neurodegenerativas **(Jamanca, 2017).**

Tabla 2

Antioxidantes presentes de manera natural en alimentos.

Alimento	Compuesto bioactivo	Propiedades antioxidantes
Zanahorias, calabaza y mango	Carotenoides	Neutraliza radicales libres y es precursor de la vitamina A.
Fresas, uvas y moras	Fenoles	Capturan radicales libres y previenen el daño oxidativo.
Cebolla y limón	Flavonoides	Antiinflamatorios, eliminan radicales libres y protegen contra el estrés oxidativo.
Manzanas y té verde	Antocianinas	Protege contra daño celular y envejecimiento.

Nota. Adaptado de "The bioactive compounds in fruits and their effects on health", por **Martínez et al. (2008),** *Dietary Activity*.

1.1.2.3. Métodos empleados para la evaluación de la actividad antioxidante

Las plantas poseen un gran número de compuestos bioactivos con elevada actividad antioxidante. En la actualidad, existen diversos métodos *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante en distintos extractos vegetales, incluyendo aquellos que se basan en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y los que dependen de la transferencia de electrones (SET). Además, existen ensayos que se clasifican de modo mixto, es decir, que combinan los métodos SET con HAT **(Moreno, Casierra y Medina,**

2023). En la **Tabla 3** se detallan las diferentes técnicas empleadas en la determinación de la actividad antioxidante.

Tabla 3

Diferentes técnicas utilizadas para medir la actividad antioxidante.

Ensayo	Fundamento	Reacción	Técnica
FRAP	Reduce el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}) a través de la formación de un complejo azul en condiciones ácidas.	SET	Colorimetría
ORAC	Disminuye la fluorescencia que se produce cuando los antioxidantes reaccionan con un radical peroxilo, como el AAPH (2,2 '-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro).	HAT	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína
ABTS	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico.	Mixta	Colorimetría
DPPH	Reacción antioxidante con un radical orgánico.	Mixta	Colorimetría

Nota. FRAP: Poder antioxidante reductor férrico; ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno; ABTS: Eliminación del catión radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); DPPH: Eliminación del radical 2,2-diphenil-1-1-picrylhdrazilo. Adaptado de **Munteanu y Apetrei (2021).**

Cabe recalcar que, entre los ensayos más utilizados para evaluar la actividad antioxidante en extractos vegetales, se destaca el DPPH por su facilidad de uso, velocidad de reacción y reproducibilidad **(Barrientos et al., 2019).** Asimismo, su implementación no demanda el empleo de equipos complejos ni reactivos de elevado costo, además posee un radical más estable que puede reaccionar incluso en extractos vegetales con antioxidantes más débiles **(Vega et al., 2024).**

Además, este ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes para donar un átomo de hidrogeno o un electrón al radical libre DPPH, un compuesto nitrogenado estable que presenta un color violeta intenso debido a su estructura electrónica. Cuando el antioxidante neutraliza al DPPH, este se reduce y

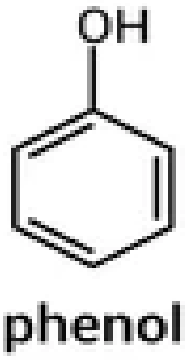
se convierte en una molécula más estable, lo que provoca un cambio en su coloración, pasando de violeta a amarillo **(Chávez, 2017).**

1.1.3. Fenoles y sus propiedades

Los fenoles son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en plantas, caracterizados por la presencia de uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático **(Rice-Evans et al., 2020).** En la **Figura 1** se muestra la forma estructural de un fenol. Estas moléculas desempeñan funciones esenciales en la fisiología vegetal, actuando como mecanismo de defensa frente a estrés oxidativo y microorganismos **(Grande-Tovar et al., 2021).**

Figura 1

Estructura química del fenol.



Nota. Adaptado de **Rice-Evans et al. (2020).**

Entre sus propiedades más destacadas se encuentra su capacidad antioxidante, que se debe a su habilidad para donar electrones o hidrógenos y neutralizar radicales libres **(Tyman, 1996).** Además, estas moléculas bioactivas actúan como agentes antiinflamatorios, antimicrobianos y anticarcinogénicos, lo que los convierte en componentes significativos en alimentos funcionales con gran interés industrial. De acuerdo con su estructura química, los fenoles se dividen en ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y estilbenos **(Suter, 2019).**

Según **Rahman et al. (2021)** menciona que, los fenoles poseen la capacidad de contrarrestar los efectos adversos asociados con el cáncer, así como enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Esta

acción se atribuye a su elevada actividad antioxidante, que les permite mitigar la reactividad perjudicial de especies reactivas de oxígeno generadas durante los procesos metabólicos del organismo **(Gasmi et al., 2022).**

1.1.4. Métodos de extracción de compuestos bioactivos

Para extraer compuestos bioactivos en materiales vegetales se utilizan diversas técnicas con el objetivo de separar los componentes deseados de la mezcla mediante el uso de líquidos, procesos mecánicos y enzimáticos. Estos pueden afectar el rendimiento de los compuestos bioactivos, por lo tanto, se emplean métodos convencionales y no convencionales **(Triggiani y Franconi, 2018).**

Referente a los métodos no convencionales requieren un volumen menor de solvente, no generan residuos tóxicos, permiten una extracción más rápida y ofrece un mayor rendimiento; entre estos se encuentran, la extracción Asistida por Ultrasonido, extracción Asistida por Microondas y la extracción de Fluidos Supercríticos **(Acosta et al., 2016).** En contraste, los métodos convencionales suelen necesitar grandes cantidades de solventes y largos tiempos de procesamiento a altas temperaturas, lo que puede comprometer la recuperación de compuestos bioactivos debido a su posible degradación; entre estos se tiene, el método Soxhlet, Maceración y Decocción **(Bagherian et al., 2015).**

De acuerdo con **Torrenegra et al. (2015),** con su estudio resalta que la técnica más empleada para extractos vegetales, es la extracción Asistida por Ultrasonido, debido a que es eficiente, sencilla y rápida en comparación con los métodos convencionales. Facilita la ruptura de las paredes celulares de la muestra mediante la cavitación generada por las ondas ultrasónicas, lo que permite una mayor liberación de compuestos bioactivos en menor tiempo. Al mismo tiempo, el calentamiento localizado del solvente favorece la difusión del extracto, optimizando la transferencia de masa en la interfase Sólido-Líquido **(Grande et al., 2021).**

1.1.5. Principales características de la mora

En la actualidad se tiene conocimiento de la existencia de más de 300 especies distintas de este fruto y alimento conocido como mora. Estas especies son nativas de Asia, Europa, y las regiones del norte y sur de América **(Reina, Rincón y Erazo, 1998).** La mora de Castilla *(Rubus glaucus*), es una especie vegetal nativa de las áreas elevadas tropicales en diversas naciones americanas, entre las que se destacan Colombia, Ecuador, Panamá, y México **(Rodríguez et al., 2023).**

El fruto de la mora de Castilla tiene una forma esférica y un tamaño que varía, llegando a medir entre 1,5 y 2,5 cm en su diámetro más grande **(Martins et al., 2023).** Por otro lado, cuando la fruta madura, el receptáculo es blanco y carnoso, en donde, la maduración comienza con un color verde, luego se torna rojiza y finalmente, adquiere un tono morado oscuro brillante. No obstante, este proceso de maduración puede experimentar variaciones influenciadas por factores como la temperatura y la humedad **(Sánchez, Real y Perez, 2013).**

Según estudios realizados por **Guerrero (2020),** se ha verificado que, la mora tiene una gran cantidad de compuestos bioactivos con actividad biológica, lo que lo convierte en un material vegetal altamente esencial para la extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Cabe mencionar, que cuando el fruto se encuentra inmaduro o con un bajo nivel de madurez, no adquiere las propiedades químicas y biológicas suficientes **(Borrego, 2018).**

1.1.5.1. Composición química de la mora

Las moras son fuentes de componentes nutricionales constituyendo así un importante aporte nutricional que podría contribuir de tal forma a una dieta equilibrada y al mejoramiento de la salud, principalmente en enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y el cáncer **(Karaklajic et al., 2023).** Además de ser rica en compuestos fenólicos los mismos que se encuentran en una concentración de alrededor del 41,24 mg/g de peso seco (PS) aproximadamente, además, de ser una excelente fuente de vitamina C (17 mg) y vitamina E (0,72 mg) **(Iza et al., 2016).** A continuación, en la **Tabla 4** se describen las principales clases de compuestos fenólicos identificados en el fruto de la mora de Castilla.

Tabla 4

Compuestos fenólicos presentes en la mora de Castilla (Rubus glaucus).

Compuestos fenólicos	Concentración (mg/g PS)
Ácido gálico	0,5 – 1,5
Ácido elágico	0,3 – 1,2
Ácido clorogénico	0,2 – 0,8
Quercetina	0,1 – 0,5

Nota. PS: peso seco del material vegetal. Adaptado de "Investigation on high-value bioactive compounds and antioxidant properties of blackberries and their fractions obtained by home-scale juice processing", por **Metzner et al. (2020),** *Sustainability*.

1.1.5.2. Producción de *Rubus glaucus* en Tungurahua

En Ecuador, la mora *(Rubus glaucus)* se cultiva específicamente en áreas que oscilan entre los 1800 a 3000 metros de altitud, localizadas en provincias como Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Carchi y Bolívar, abarcando aproximadamente 5200 hectáreas **(Jácome, 2023).** La provincia de Tungurahua es reconocida por ser uno de los principales centros de producción de mora de Castilla en el sector agrícola, lo que la posiciona como el principal proveedor de este cultivo a nivel nacional, según información de la Dirección de Producción del Gobierno Provincial de Tungurahua. En donde, alrededor del 60% de la producción de mora de castilla en Ecuador proviene de esta provincia, siendo los cantones de Tisaleo y Píllaro los de mayor producción **(Medina, 2023).**

En el caso específico de Tisaleo, más del 40% de sus habitantes se dedican al cultivo de la mora de castilla *(Rubus glaucus)*, es decir, producen alrededor de 12 toneladas de mora semanalmente, lo que ha motivado la creación de una feria provincial para facilitar la comercialización directa de esta fruta. Además, este fruto tiene un gran valor comercial y es altamente demandada tanto para consumo fresco como procesado, permitiendo la elaboración de diferentes productos tales como: vinos, helados, mermeladas, entre otros **(Isaza y Jaramillo, 2020).**

1.1.6. Vida útil

La vida útil es el período de tiempo durante el cual un producto, alimento o medicamento mantiene sus características esenciales, como la calidad, seguridad y propiedades biológicas, bajo condiciones específicas de almacenamiento desde su fabricación hasta su consumo o uso final **(Sepúlveda y Zapata, 2019).** En los últimos años, la evaluación de la actividad de la vida útil de los extractos vegetales ha ganado mayor relevancia debido a sus aplicaciones potenciales en diversas industrias alimentarias y farmacéuticas. Además, son altamente valorados por sus beneficios terapéuticos para el mejoramiento de la salud **(Murillo, Mendoza y Alcívar, 2023).** Sin embargo, la información que se tiene sobre el análisis de tiempo de vida útil de un extracto principalmente obtenido a partir de la mora es limitada. Por esta razón, es de gran utilidad realizar un estudio de estabilidad del extracto, ya que, asegura la

conservación de su actividad biológica. Para garantizar la calidad y seguridad de estos productos se puede utilizar como referencia lo señalado por el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) **(European Medicines Agency, 2003).**

Diversos factores influyen en las propiedades de estos extractos, como la exposición a la luz, la temperatura y el tipo de envase. Entre los envases para almacenar, se recomienda utilizar botellas de tipo color ámbar con tapa hermética, lo que previene la entrada de aire u otros contaminantes que podrían afectar la calidad del extracto, además, desempeñan una función esencial al proteger contra la oxidación. **(Rodríguez et al., 2015).** Dentro del estudio de estabilidad se puede evaluar diversos ensayos en dependencia del producto a analizar para asegurar que se mantenga su calidad y eficacia en el tiempo, como pueden ser el pH, actividad biológica y concentración de compuestos bioactivos **(Guerra y Corzo, 2023).**

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y el tiempo de vida útil de un extracto obtenido a partir de la mora *(Rubus glaucus).*

1.2.2. Objetivos específicos

- Extraer compuestos fenólicos procedentes de la mora utilizando un método de extracción Sólido-Líquido.
- Analizar la capacidad antioxidante del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos.
- Estimar el tiempo de vida útil del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos.

CAPITULO II.-METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En las Tablas 5,6 y 7 se enlistan los equipos, reactivos y materiales fungibles que se utilizaron durante la investigación.

Tabla 5

Equipos de laboratorio empleados.

Equipos	Cantidad
Deshidratador por convección (SMART HEAT 541650)	1
Balanza analítica (Ohaus N13M1U)	1
Baño ultrasónico (Branson CPX2800H)	1
Espectrofotómetro (Fisher Scientific ACCUSKAN GO)	1
pH-metro (METTLER TOLEDO SEVEN COMPACT)	1
Refrigerador (Indurama N2BE8U)	1

Tabla 6

Reactivos de laboratorio empleados.

Reactivo	Cantidad
Reactivo de Folin-Ciocalteu	10 mL
Carbonato de sodio 7% (p/v)	100 mL
Etanol 96%	4 L
Solución madre Acido gálico	0,01 g
Solución madre DPPH	0,00591 g
Agua destilada	5 L
Metanol	50 mL
Solución madre Trolox	0,0125 g

Tabla 7

Material fungible de laboratorio empleados.

Material fungible	Cantidad
Botellas ámbar (250 mL)	5
Matraces Erlenmeyer (250 mL)	2
Matraces aforados (100 mL)	1
Vasos de precipitación (50 - 250 mL)	6
Probeta graduada (100 mL)	1
Paquete papel aluminio	1
Papel filtro	3
Micropipeta (10 – 1000 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	1
Microplacas de 96 pocillos	1
Paquete de fundas Ziploc	1

2.2. Métodos

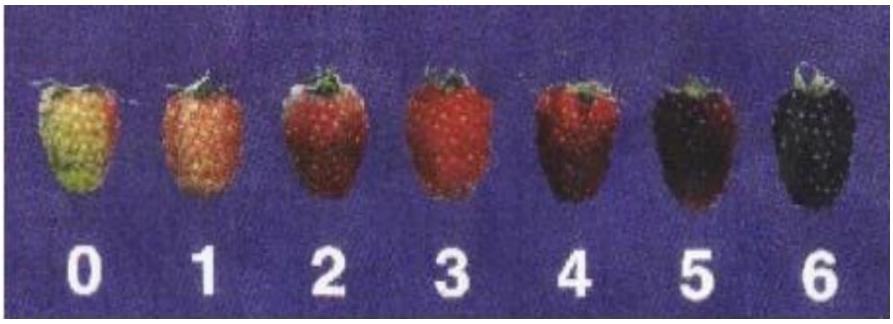
2.2.1. Extracción de compuestos fenólicos procedentes de la mora utilizando un método de extracción Sólido-Líquido

2.2.1.1. Recolección de la materia prima

La mora fue recolectada del Mercado Municipal San Miguel ubicado en el cantón Tisaleo, provincia de Tungurahua, específicamente en el puesto # 1130, en donde, las muestras se tomaron en un estadio 5 de madurez con base en el color externo utilizando la Tabla de colores estándar INEN 2427 **(INEN, 2010)** el cual, se muestra en la **Figura 2**. Además, se verificaron que estén libres de daños físicos y signos de deterioro ocasionado por plagas y enfermedades. Una vez recolectada la mora, se almacenó en recipientes de plástico, con su respectiva rotulación y fueron transportadas hacia el Laboratorio 1.1 de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato para su posterior análisis.

Figura 2

Tabla de colores estándar de la mora de Castilla (Rubus glaucus).



Nota. Esta figura muestra una escala de color de *Rubus glaucus* a través de una modificación numérica para cada estado de madurez. Adaptado de **INEN (2010).**

2.2.1.2. Preparación del material vegetal

Una vez recolectado el material vegetal, se lavó suavemente con agua destilada para eliminar la presencia de impurezas. Para este apartado, se utilizó el método descrito por **Aguirre (2019),** con ligeros cambios, en donde la mora se sometió a un proceso de secado dentro de un deshidratador por convección (SMART HEAT 541650) a 60ºC por un tiempo de 45 horas, con el propósito de retirar la humedad. Posteriormente, se procedió a triturar con la ayuda de una licuadora OSTER. Se almacenaron en fundas Ziploc a temperatura ambiente y finalmente se pesó el material obtenido en una balanza analítica, anotando su peso **(Auquiñivin y Paucar, 2020).**

2.2.1.3. Obtención del extracto vegetal

Los extractos vegetales se obtuvieron empleando un baño de ultrasonido (Branson CPX2800H), siguiendo como referencia la metodología detallada por **Kim et al. (2014),** con ligeras modificaciones. Para esto, se pesó 6,5 g de muestra seca y se utilizó etanol al 96% como solvente y se colocó en balones de aforo de 1000 mL utilizando distintas concentraciones de etanol/agua (80:20% y 50:50%) v/v. Posteriormente, en matraces Erlenmeyer se mezclaron 6,5 g de muestra seca con 200 mL del solvente, las cuales fueron trasladadas al baño de ultrasonido a una temperatura de 35ºC. El tiempo de extracción para cada una de las muestras fue de 20 y 60 min. Cabe mencionar que, estas variaciones de tiempo de extracción y concentración del solvente se basaron en estudios preliminares descritos por **Vélez et al. (2022),** que resalta cómo estas variables han sido fundamentales para la obtención del contenido de

compuestos fenólicos presentes en la mora. Finalmente, los extractos se filtraron con la ayuda del papel filtro y se almacenaron en botellas tipo ámbar dentro de un refrigerador.

2.2.1.4. Planteamiento del diseño experimental

Para el análisis de los resultados obtenidos, se aplicó un diseño experimental 2^2, incluyendo como Factor A, la concentración del solvente etanol/agua (80:20% y 50:50%) v/v. En cambio, el Factor B representó el tiempo de extracción de 20 y 60 min. Para conocer la influencia de cada factor sobre el contenido fenólico de los extractos obtenidos se utilizó el paquete estadístico Minitab en su versión gratuita, a través de un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$).

2.2.1.5. Determinación de la concentración de fenoles totales

Para la determinación de la concentración fenólica de cada extracto se aplicó la metodología descrita por **Pérez-Cabeza et al. (2018),** con algunas modificaciones. Se empleó el método Folin-Ciocalteu, en donde, se utilizó una placa de 96 micropocillos. En cada pocillo, se mezcló 130 µL de agua destilada con 10 µL de cada extracto diluido, seguidamente se añadió 10 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 2N. Después que haya reaccionado durante 6 minutos, se colocó 100 µL de una solución al 7 % (p/v) de Carbonato de sodio (Na_2CO_2), posteriormente se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Finalmente, transcurrido ese tiempo se procedió a medir la absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific AccuSkan Go, con una longitud de onda de 750 nm **(Wang et al., 2012).** Para llevar a cabo la curva de calibración se utilizó un compuesto fenólico, que fue el ácido gálico (GAE) como estándar y se realizaron diluciones que oscilan entre 10 a 100 mg/L **(Bobo-García et al., 2015).** El contenido fenólico se expresó en equivalentes de miligramos de ácido gálico por gramo de peso seco (mg GAE/g PS).

2.2.2. Análisis de la capacidad antioxidante del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos

2.2.2.1. Preparación del ensayo para evaluar la actividad antioxidante

El extracto que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos fue analizado para evaluar su actividad antioxidante utilizando el método-DPPH (2,2-diphenil-1-1-picrylhdrazilo), el cual se basa en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno desde un antioxidante al radical libre DPPH. Cuando el antioxidante dona un átomo de hidrógeno o un electrón al DPPH, éste se reduce, transformándose en una molécula más estable. Este proceso genera un cambio en la coloración de la solución, que pasa de violeta intenso (estado oxidado) a amarillo pálido (estado reducido) **(Barrientos et al., 2019).**

Para esta evaluación se tomó como referencia la metodología descrita por **Bobo-García et al. (2015)**, modificada, en donde, se utilizó una placa de 96 micropocillos. En cada pocillo, se mezclaron 20 µL de extracto diluido junto con 180 µL del reactivo DPPH disuelto en metanol-agua en una proporción (80:20 v/v). Luego, la placa fue incubada por 45 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 515 nm. Para realizar la curva de calibración se empleó el reactivo Trolox a una concentración estándar entre 50 a 500 µmol/L.

2.2.2.2. Análisis de la actividad antioxidante

El porcentaje de inhibición del DPPH fue calculado utilizando la Ecuación 1 descrita por **Bobo-García et al. (2015).**

$$\%\ Inhibición\ DPPH = \left[1 - \left(\frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{control} - A_{blanco}}\right)\right] * 100 \qquad \textbf{(1)}$$

Donde;

A_{blanco} = Absorbancia de agua con metanol-agua (80:20 v/v).

$A_{muestra}$ = Absorbancia del extracto.

$A_{control}$ = Absorbancia de agua con la solución DPPH.

2.2.3. Estimación del tiempo de vida útil del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos

La determinación del tiempo de vida útil se realizó al extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos, el cual para este estudio de estabilidad se empleó el método descrito por **Aubourg (2023) y Esparza et al. (2020),** con ligeras modificaciones. El extracto final obtenido se colocó en una botella de 500 mL de tipo color ámbar con una tapa hermética, lo cual permite proteger el contenido de la degradación ocasionada por la exposición de la luz solar. Luego, se almacenó en una refrigeradora (Indurama N2BE8U) a una temperatura de 2 a 8 °C. La frecuencia de muestreo se realizó cada semana (0, 7, 15, 21 y 30) durante 30 días con el fin de realizar los ensayos que se detallan a continuación. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.2.3.1. Determinación del pH

Para determinar el pH se utilizó un potenciómetro (Mettler Toledo - 8754967), siguiendo la metodología descrita por **Culque y Urbina (2023).** Se incorporó 20 mL del extracto diluido en un vaso de precipitación de 50 mL, posterior a esto se midió el pH, el cual, presentó una lectura directa del resultado.

2.2.3.2. Determinación de la concentración de fenoles totales del extracto

Para este apartado, se determinó el contenido de compuestos fenólicos en el extracto diluido de mora, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.1.5. respectivamente.

2.2.3.3. Determinación de la actividad biológica del extracto

Para este ensayo, se consideró analizar la actividad antioxidante presente en el extracto diluido de mora, el cual se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.2. respectivamente.

2.2.3.4. Determinación del tiempo de vida útil

Con los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos mediante la herramienta estadística Minitab Stastical Software versión 17 el mismo que cuenta con una licencia gratuita de 30 días, se realizaron comparaciones de medias y se estableció si existe diferencias significativas entre cada uno de los tiempos, empleando la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Asimismo, a través de las funciones disponibles en esta herramienta, se determinó el tiempo de vida útil del extracto. Además, para corroborar los resultados obtenidos por el software, se realizaron gráficas de la concentración del contenido fenólico contra el tiempo y se determinó la velocidad de reacción a través de la pendiente, permitiendo calcular el tiempo de vida media y el tiempo de vida útil. Es fundamental destacar que la vida media de una reacción se refiere al tiempo necesario para que el fármaco o la concentración inicial de los compuestos analizados se reduzcan en un 50%, mientras que la vida útil se define como el tiempo requerido para que ocurra un 10% de degradación **(Lozano et al., 2012).** La reacción de la cinética de degradación puede seguir diferentes órdenes, entre los cuales se encuentran: orden 0 y orden 1 **(Blum, 2007).**

Este estudio de estabilidad es de gran importancia en estas condiciones de almacenamiento ya que puede afectar la velocidad de degradación del compuesto de interés **(Lozano et al., 2012).** En la **Tabla 8**, se muestran las ecuaciones correspondientes que se utilizaron, según el orden de reacción de degradación obtenido de la cinética de degradación.

Tabla 8

Parámetros cinéticos correspondientes a los distintos órdenes de reacción de degradación.

Orden de reacción	Vida media	Vida útil
Orden cero	$t_{1/2} = \frac{[F]_0}{2k_0}$	$t_{10\%} = \frac{0{,}1[F]_0}{k_0}$
Primer orden	$t_{1/2} = \frac{ln2}{k_1}$	$t_{10\%} = \frac{0{,}104}{k_1}$

Nota. F: concentración del compuesto de interés; k: velocidad de reacción. Adaptado del "Manual de Tecnología Farmacéutica", por **Lozano et al. (2012),** *Fotoletra S.A.*

CAPITULO III.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Extracción de compuestos fenólicos procedentes de la mora utilizando un método de extracción Sólido-Líquido

La obtención de compuestos fenólicos provenientes de la mora *(Rubus glaucus)*, se realizó mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido **(Anexo 1),** método que se destaca por ser eficiente, sencillo y rápido en comparación con los métodos convencionales. En un estudio presentado por **Matei et al. (2023),** se identificó que las ondas ultrasónicas provocan una ruptura mecánica de las paredes celulares, liberando los compuestos fenólicos de la mora, en un rango de temperatura recomendado entre 35 y 45 (°C). Simultáneamente, el calentamiento localizado del solvente potencia la difusión del extracto, optimizando la transferencia de masa en la interfase sólido-líquido **(Torres et al., 2017).**

Los disolventes más utilizados para la obtención de extractos vegetales incluyen metanol, acetona y etanol. En este estudio, se optó por el uso del etanol, cuya polaridad es menor que la del agua. Sin embargo, al utilizar una mezcla agua-etanol se obtiene una extracción más eficiente, esto se debe a que el etanol, siendo un disolvente polar como el agua, interactúa con los grupos hidroxilo (-OH), formando enlaces de hidrógeno que facilitan tanto su solubilidad como la liberación de los compuestos fenólicos **(Omar et al., 2021)**. Es así, que se preparó etanol a concentraciones de 50 y 80% y se varió el tiempo de extracción de 20 y 60 minutos.

La cuantificación del contenido fenólico total de los extractos obtenidos a partir de la mora, correspondientes a los 4 tratamientos establecidos, se llevó a cabo utilizando una curva de calibración de ácido gálico como estándar. La misma que presentó una ecuación de regresión lineal y = 0,0029 [GAE]+ 0,0746 con un coeficiente de determinación R^2 = 0,9989 **(Anexo 3).** Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la **Tabla 9,** en donde se observa que el T1 (concentración de etanol del 50% y tiempo de extracción de 20 min) fue el que presentó un mayor contenido fenólico alcanzando un valor de 62,594 ± 3,928 mg GAE/ g PS, en comparación con el T4 (concentración de etanol del 80% y tiempo de extracción de 60 min) que registró un menor contenido con un valor de 27,735 ± 1,519 mg GAE/ g PS **(Anexo 4).**

Tabla 9

Cuantificación del contenido fenólico total de los extractos obtenidos a partir de la mora.

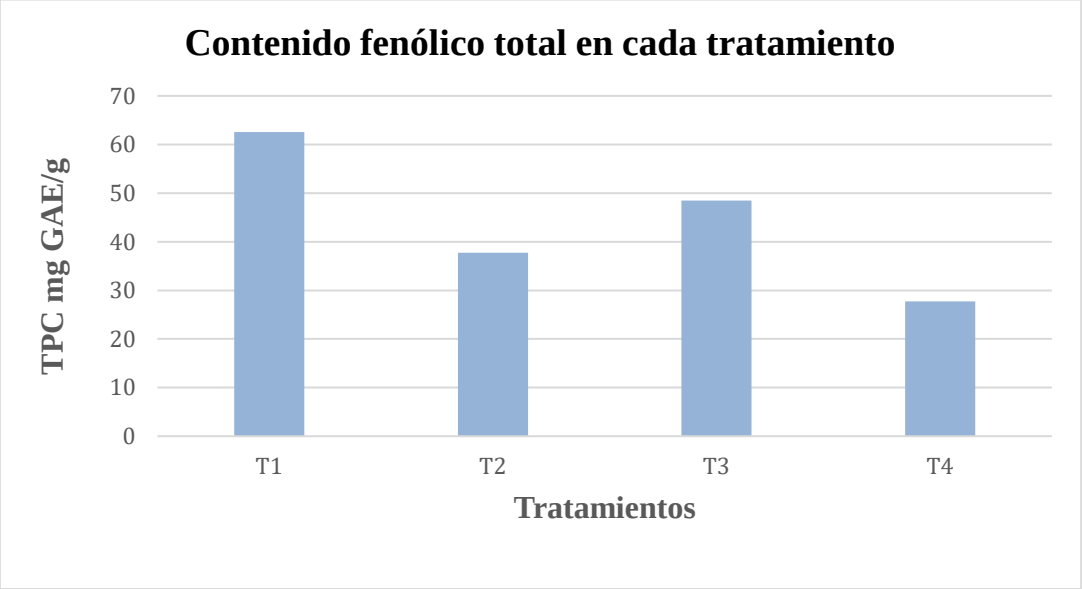
Tratamientos	Concentración de etanol	Tiempo de extracción	Contenido fenólico total (mg GAE/ g PS)
T1*	50%	20 min.	62,594 ± 3,928
T2	80%	20 min.	37,731 ± 1,788
T3	50%	60 min.	48,483 ± 1,333
T4	80%	60 min.	27,736 ± 1,519

Nota. *Tratamiento con mayor contenido fenólico. Los resultados obtenidos son expresados como media ± desviación estándar.

El valor obtenido del contenido fenólico proveniente del mejor tratamiento (62,594 ± 3,928 mg GAE/ g PS) **(Figura 3)** presentó una ligera relación con lo reportado por **Ramón y Garzón (2021)** que al utilizar la misma técnica de extracción reflejó una concentración aproximada de 55,47 ± 1,34 mg GAE/ g PS. La diferencia en los resultados entre ambos estudios podría está relacionada con la temporada del año y la región geográfica donde se recolectaron la mora, ya que se ha comprobado que los factores ambientales influyen en el contenido de compuestos bioactivos en diversas especies vegetales **(Acosta-Montoya et al., 2010).**

Figura 3

Contenido de compuestos fenólicos obtenidos en los extractos de mora en cada tratamiento.



Nota. T1: etanol 50% - 20 minutos; T2: etanol 80% - 20 minutos; T3: etanol 50% - 60 minutos; T4: etanol 80% - 60 minutos.

En un estudio realizado por **Espada-Bellido et al. (2019**) se obtuvo un valor de contenido fenólico de 118,29 ± 0,26 mg GAE/ g PS que es superior al obtenido en este estudio. La diferencia en los resultados podría deberse al tipo de disolvente utilizado, ya que en el estudio citado se empleó acetona, donde permite un mayor rendimiento de extracción debido a su polaridad intermedia, que le confiere la capacidad de solubilizar tanto compuestos polares como apolares. Además, su punto de ebullición relativamente bajo permite concentrar los extractos sin degradar los compuestos sensibles. Sin embargo, el etanol es más sostenible y menos dañino para el medio ambiente en comparación de la acetona **(Cucullu et al., 2019).**

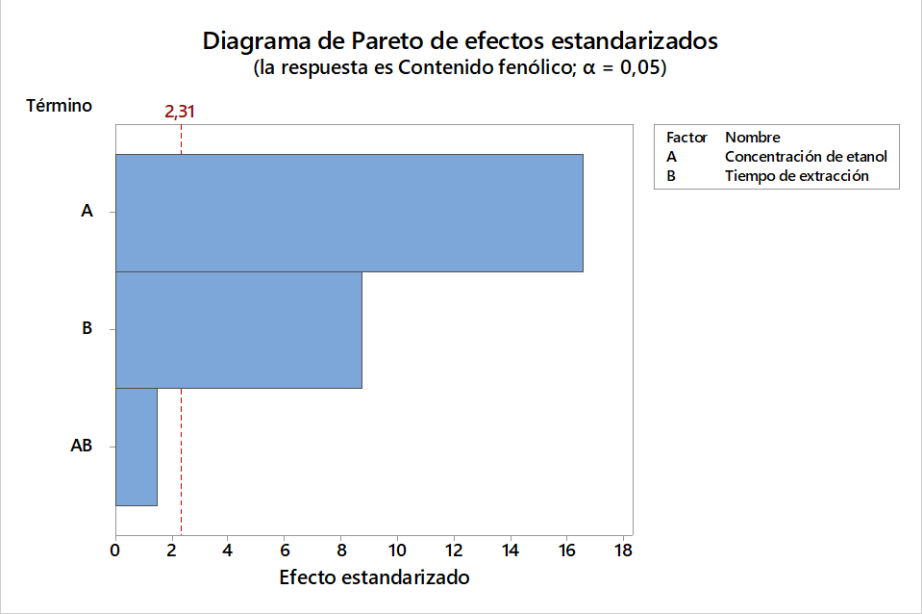
Asimismo, **Rojas-Llanes et al. (2014)** en su investigación alcanzó un valor de TPC de 30,16 ± 1,00 mg GAE/ g PS, al aplicar el método de Maceración, valor que es significativamente inferior al obtenido en el presente estudio. De igual forma, un análisis realizado por **Vázquez-Vázquez et al. (2024)** determinaron un contenido fenólico de 58,76 ± 1,75 mg GAE/ g PS en mora empleando la técnica Soxhlet. Esta relevante diferencia está relacionada con el método de extracción, ya que estos métodos requieren tiempos prolongados y alta cantidad de solventes para liberar los compuestos bioactivos, lo que puede resultar en una menor recuperación de TPC y aumentar los costos operativos.

3.1.1.1. Análisis estadístico

El análisis de varianza ANOVA realizado considerando un nivel de confianza del 95% **(Anexo 6)** indicó que los factores evaluados son estadísticamente significativos ($p < 0,05$), lo que confirma que el contenido fenólico del extracto depende de la concentración de etanol (A) y el tiempo de extracción (B). No obstante, la interacción de las dos variables (AB) no resultó significativa ($p > 0,05$). La influencia de estos factores y su interacción sobre TPC se muestra en el diagrama de Pareto presentado en la **Figura 4.**

Figura 4

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el contenido fenólico en los extractos de mora.



Nota. Las barras horizontales de los factores y su interacción que sobrepasan la línea de referencia son los que presentan un efecto significativo sobre el contenido fenólico.

Por su parte, la **Figura 5,** muestra los efectos principales de cada factor de este estudio, en donde se puede apreciar que a una concentración de etanol al 50% se logró obtener un alto contenido fenólico. De acuerdo con el estudio de **Garzón et al. (2022)** se observó que un aumento de TPC se alcanza utilizando un valor de 50%, ya que niveles más altos de este disolvente resultaron tener una menor cuantificación de compuestos fenólicos. Otros factores que influyen incluyen la composición química de la muestra, las condiciones de extracción (tiempo y temperatura) y la posible mezcla con agua, que ajusta la polaridad del disolvente para optimizar la solubilización.

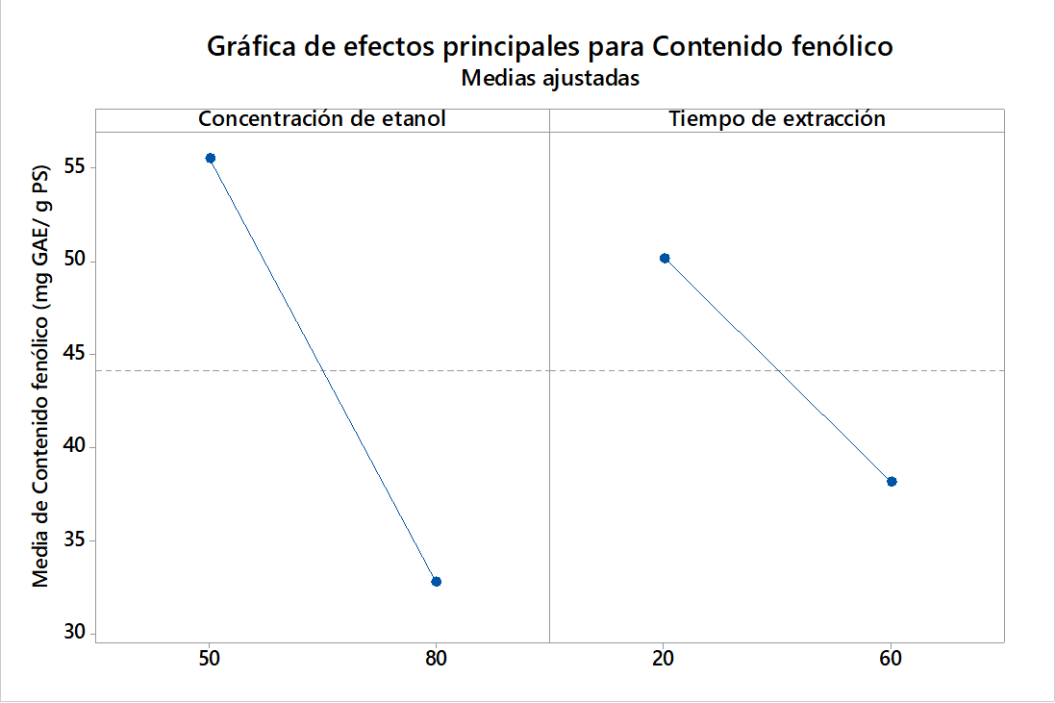
De igual forma, **Estupiñán et al. (2021)** concluyen que los mejores resultados de TPC en extractos de mora se obtienen empleando una mezcla de etanol y agua (50-50%), debido a que permite una extracción eficiente, dado que mejora la solubilidad del contenido fenólico sin importar la polaridad que estos poseen, ya que el agua al ser más polar que el etanol tiene la capacidad de establecer puentes de hidrógeno fuertes. **Tran et al. (2023)** señala, además, que al emplear concentraciones de etanol cercanas al 100%, produce la deshidratación del tejido vegetal, lo cual podría inducir la degradación de ciertos compuestos fenólicos sensibles.

En cuanto a la variación del tiempo de extracción presentó una diferencia significativa sobre el contenido fenólico obtenido, en donde, se observa que a medida que disminuye el tiempo aumenta el contenido de TPC durante la extracción. Según **Jiménez-Morales et al. (2022)** en su estudio resaltan que, esto podría deberse a que los compuestos fenólicos pueden ser sensibles a procesos de oxidación debido a la exposición prolongada al solvente, oxígeno y temperatura, lo que explica la reducción en su concentración en un tiempo de 60 minutos.

Además, esta variación se debe a las interacciones químicas no deseadas o a la temperatura del baño ultrasónico. Un tiempo más prolongado puede favorecer la formación de enlaces entre los compuestos fenólicos y otros componentes de la matriz vegetal, dificultando su extracción. **Sik et al. (2024)** en su estudio menciona que, a 35°C es lo suficientemente baja para evitar la degradación térmica de compuestos bioactivos sensibles, como los fenoles y flavonoides, pero lo suficientemente alta para aumentar la solubilidad y difusión de los compuestos.

Figura 5

Gráfica de efectos principales para el contenido fenólico en los extractos de mora.



Nota. Según la concentración de etanol (50 y 80%) y el tiempo de extracción (20 y 60 min) afectaron considerablemente la concentración de contenido fenólico en los extractos elaborados a partir de la mora.

3.1.2. Análisis de la capacidad antioxidante del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos

Los antioxidantes son moléculas sintetizadas de manera natural por las plantas como parte de sus mecanismos de defensa ante condiciones de estrés. Los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante. Según **Suárez et al. (2020)** mencionan que esto se debe a la capacidad de los fenoles para reaccionar con los radicales libres.

La técnica que se empleó para analizar la capacidad antioxidante del extracto de mora que presentó mayor concentración de compuestos fenólicos (Tratamiento 1), fue el ensayo 2,2-diphenil-1-1-picrylhdrazilo (DPPH). En el **Anexo 7** se visualiza la microplaca del ensayo DPPH, en la cual se muestra variaciones de color que van desde violeta intenso hasta amarillo. **Jadid et al. (2019)** resalta que, este ensayo se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes presentes en el extracto para donar átomos de hidrógeno, reduciendo el radical libre DPPH, que en su estado original es de color púrpura. Al reaccionar con los antioxidantes, el DPPH se reduce y su color se desvanece hacia amarillo pálido, el cual la magnitud de este cambio de color está directamente relacionada con la cantidad de los antioxidantes presentes en el extracto de mora **(Hara et al., 2018).**

A continuación, en la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición de DPPH que se calculó mediante la Ecuación 1 **(Anexo 9)** y los µmol equivalentes de Trolox. Para este análisis, se utilizó la ecuación de regresión lineal y = 0,1494 [Trolox]+ 8,2551, derivada de la curva de calibración de Trolox, la cual presentó un coeficiente de determinación de R^2 = 0,9984 **(Anexo 8).**

Tabla 10

Actividad antioxidante proveniente del extracto de mora.

Concentración de etanol (%)	Tiempo de extracción (min)	% Inhibición de DPPH	µmol Eq. Trolox/g PS
50	20	90,544 ± 0,969	161,003 ± 1,896

Nota. Los resultados obtenidos son expresados como media ± desviación estándar.

La capacidad de inhibición de DPPH presente en el extracto de mora fue de 90,544% con 161,003 µmol Eq. Trolox/g PS **(Anexo 10),** lo que sugiere que los compuestos fenólicos recuperados de la mora presentan una elevada actividad antioxidante. El resultado obtenido en el presente estudio es similar a lo reportado por **Grande-Tovar et al. (2021)** que identificaron que los extractos de *Rubus glaucus* presentan un porcentaje de inhibición del 91,83%.

No obstante, en un estudio llevado a cabo por **Reyes-Carmona et al. (2021)** determinaron que los extractos de mora obtenían un porcentaje de inhibición del radical DPPH del 137,42%. Mientras que, **Hidalgo y Almajano (2017)** obtuvieron un porcentaje de inhibición de 81,35% de capacidad antioxidante de fenoles extraídos de la mora, en donde, los resultados obtenidos presentan valores similares con respecto a las investigaciones. La variación de estos resultados podría estar relacionada con los factores climáticos de las regiones donde se desarrolla la especie vegetal, ya que estos influyen directamente en el contenido de compuestos fenólicos, los cuales inciden en la capacidad antioxidante.

En cuanto a la concentración equivalente de Trolox obtenida para el extracto fue de 161,003 ± 1,896 µmol Eq. Trolox/g PS, siendo este inferior a lo reportado por **Memete et al. (2023),** en donde encontraron que la mora alcanzó una actividad antioxidante de 251,90 µmol Eq. Trolox/g PS respectivamente. Estas diferencias significativas, se deben a la relación del tipo de disolvente utilizado para la obtención de extractos fenólicos de la mora, ya que en esta investigación utilizaron acetona-agua como disolventes. Según **Garzón et al. (2022)** la capacidad antioxidante está estrechamente vinculada al contenido total de fenoles en el extracto. La relación acetona-agua tiene una polaridad intermedia, ya que la acetona es menor polar que el etanol, esto permite solubilizar una gama más amplia de compuestos. Sin embargo, una relación etanol-agua es más óptima para extraer compuestos más polares, como compuestos fenólicos.

En la investigación realizada por **Samaniego et al. (2020)** se encontró que la mora tiene valores que varían entre 50,61 a 324,01 µmol Eq. Trolox/g PS, al aplicar el ensayo ABTS, datos que son significativamente superiores a las obtenidas en el presente estudio. Esta relevante diferencia podría estar relacionada con la técnica seleccionada para evaluar la capacidad antioxidante, ya que el ensayo ABTS es capaz de detectar tanto antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos, lo que incrementa la capacidad antioxidante en el extracto analizado. No obstante, existe la posibilidad que este método sobrestime la actividad antioxidante, dado que algunos compuestos fenólicos con bajos potenciales redox pueden reaccionar con este radical **(Babbar et al., 2016).**

Con base en las investigaciones citadas, se puede inferir que la mora *(Rubus glaucus)* poseen un contenido alto de capacidad antioxidante, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en este presente estudio. Asimismo, se observa que la cuantificación de dicha actividad antioxidante presenta variaciones significativas en comparación con los resultados reportados por otros autores. Estas discrepancias están relacionadas con factores como los métodos de extracción empleados, las condiciones climáticas, las distintas variedades de la especie vegetal y las técnicas seleccionadas para medir la capacidad antioxidante.

3.1.3. Estimación del tiempo de vida útil del extracto con mayor concentración de compuestos fenólicos

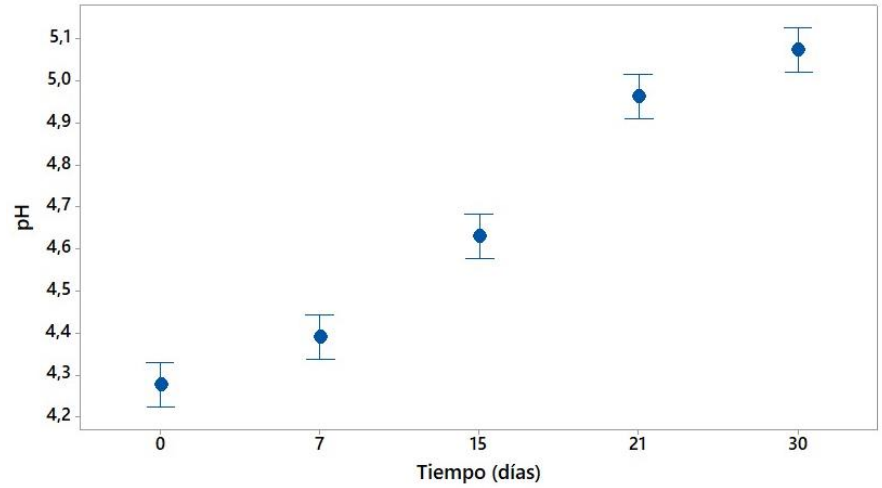
Para estimar la vida útil del extracto procedente de la mora con mayor concentración de compuestos fenólicos, se analizaron diferentes ensayos, incluyendo el pH, la concentración de fenoles totales y su actividad biológica. Estas evaluaciones se realizaron cada semana (0, 7, 15, 21 y 30) durante 30 días, por triplicado. La utilización de la herramienta Minitab Stastical Software, que cuenta con un paquete estadístico especializado en estudios de estabilidad, permitió realizar comparaciones de medias y predecir el tiempo de vida útil del extracto de mora.

3.1.3.1. Determinación del pH

En la **Figura 6** se aprecia que existe una tendencia ascendente en los valores de pH del extracto de mora durante un período de 30 días, lo cual indica una diferencia significativa ($p < 0,05$), en sus características químicas a lo largo del tiempo **(Anexo 12 y 13).** A su vez, se puede observar que entre los días 7 y 21 se registró un mayor aumento de pH en el extracto. Estos cambios pueden estar asociadas con diversas reacciones que ocurren entre estos compuestos, como las de oxidación y reducción **(Figueroa et al., 2019).**

Figura 6

Comparación de medias con respecto al pH en el extracto de mora.

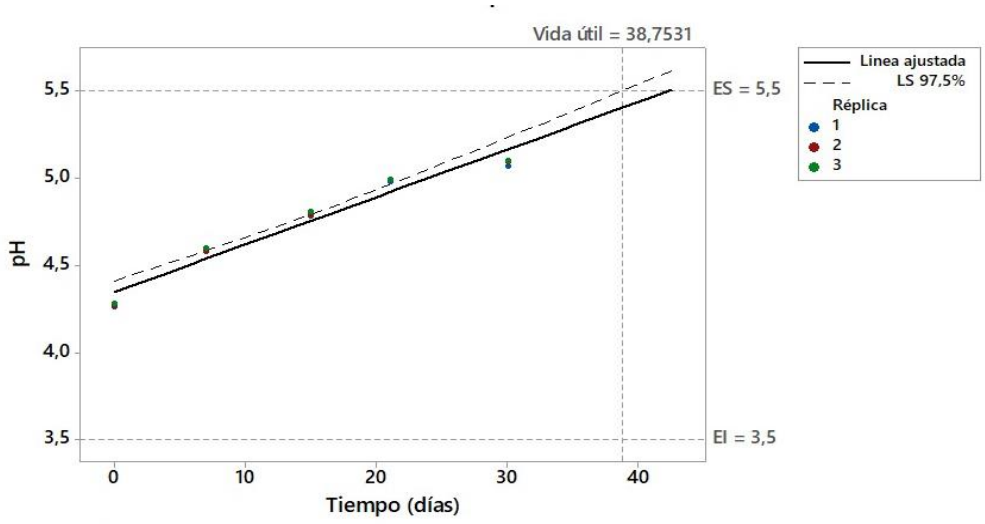


Nota. La comparación de medias se realizó utilizando Tukey, aplicando un nivel de confianza del 95%.

Los límites de especificación (3,5 a 5,5) se establecieron en base a la información presentada por **Friedman y Jürgens (2020)** en donde indican que, los compuestos fenólicos son más estables en un entorno ácido, es decir, se puede utilizar un valor superior e inferior al 5%, en relación al contenido inicial que fue de 4,25 ± 0,010. Como resultado de este análisis, se obtuvo una vida útil de 38,7531 días, lo cual se aprecia en la **Figura 7**, lo que se observa un aumento progresivo con el paso de los días. Estas variaciones podrían estar relacionados con una posible contaminación microbiana o con procesos de oxidación, como lo señalan **Cao y Xiong (2017).**

Figura 7

Pronóstico del tiempo de vida útil del extracto en relación al pH.



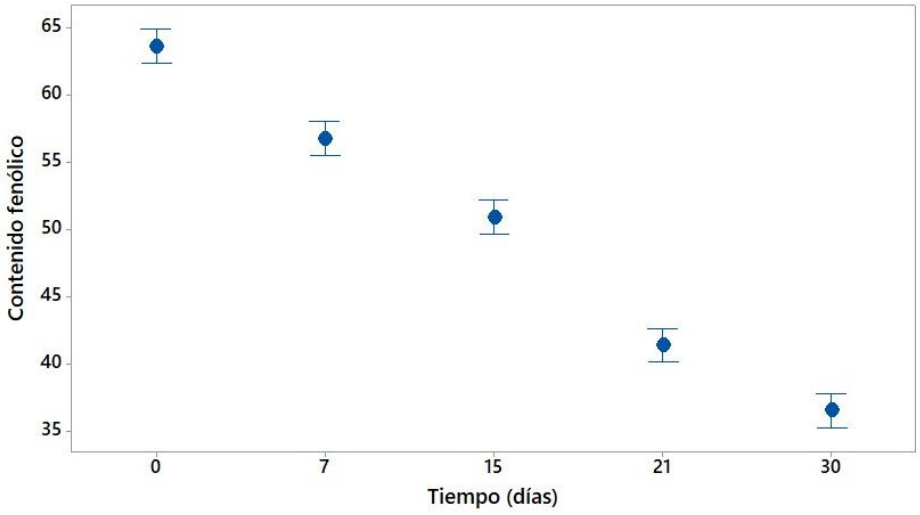
EI = Especificación inferior, ES = Especificación superior
Ecuación para la línea ajustada: pH = 4,35 + 0,0273 días

3.1.3.2. Determinación de la concentración de fenoles totales del extracto

Con respecto al análisis de estabilidad en función del contenido fenólico del extracto, se logra observar en la **Figura 8**, una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los intervalos, iniciando con un valor de 62,594 mg GAE/g PS y disminuyendo gradualmente hasta 36,891 mg GAE/g PS al día 30. A su vez se aprecia que entre los días 15 y 21 se presentó una mayor disminución de fenoles totales.

Figura 8

Comparación de medias con respecto a la concentración de compuestos fenólicos en el extracto.

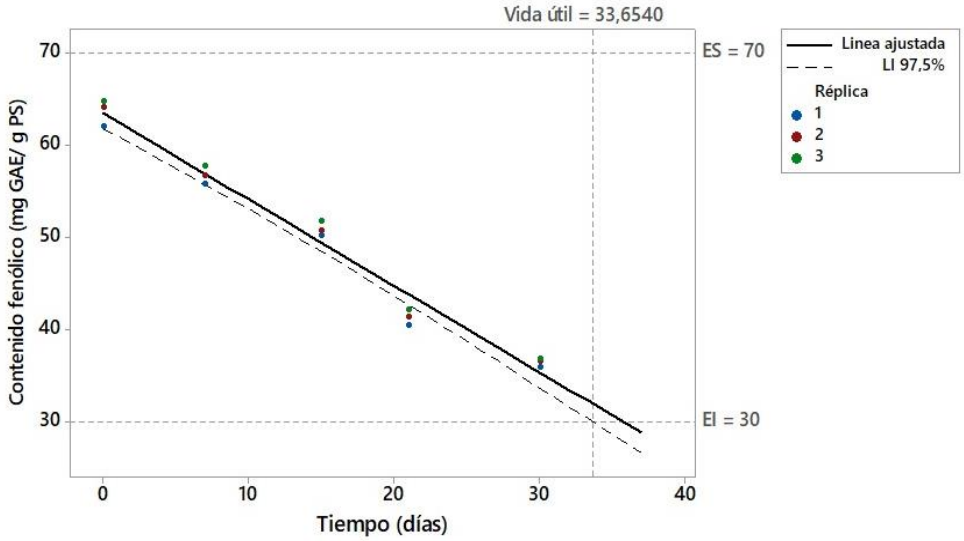


Nota. La comparación de medias se realizó utilizando Tukey, aplicando un nivel de confianza del 95%.

Con base en los resultados mostrados en la **Figura 9**, el paquete estadístico utilizando un nivel de confianza del 95%, estimó una vida útil de 33,6540 días en relación con el contenido de TPC **(Anexo 14 y 15).** Para la elección de los límites de especificación se siguió lo presentado por **Gan y Baroutian (2022)** quienes consideraron que una concentración demasiado baja de compuestos fenólicos podría comprometer la actividad biológica y utilidad del extracto, es por ello que en el presente estudio se determinaron una especificación inferior de 30 mg GAE/ g de peso seco y una especificación superior de 70 mg GAE/ g de peso seco. Según **Chethan y Malleshi (2017)** mencionan que, se debe considerar que la variación del pH también puede afectar la estabilidad de los compuestos fenólicos presentes en el extracto.

Figura 9

Pronóstico del tiempo de vida útil del extracto de mora en relación al contenido fenólico.



EI = Especificación inferior, ES = Especificación superior
Ecuación para la línea ajustada: Contenido fenólico = 63,5 - 0,937 días

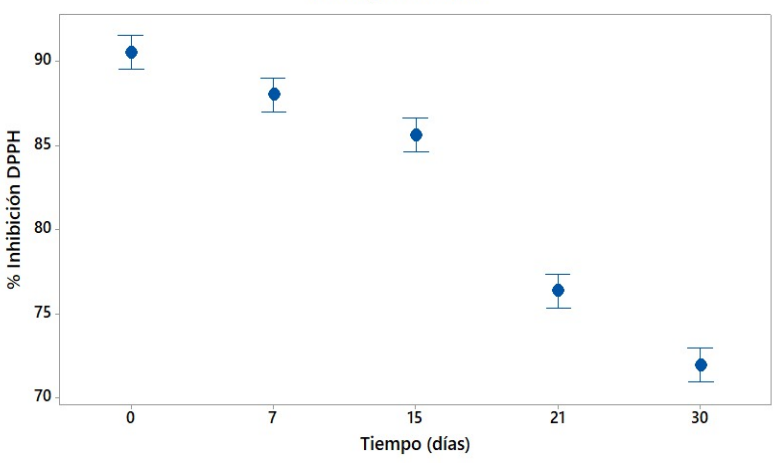
De igual forma, en la **Figura 9** se observó que, el contenido fenólico experimentó una degradación moderada durante los 30 días de evaluación del extracto de mora. Este comportamiento podría estar relacionado con el uso de frascos de vidrio tipo color ámbar y su almacenamiento a temperaturas entre 2 a 8°C. **Mindola (2021)** resalta que, la degradación de muchos de estos compuestos puede ralentizarse cuando se conserva en condiciones de refrigeración generalmente dentro de un rango de 4 a 8°C.

3.1.3.3. Determinación de la actividad biológica del extracto

En la **Figura 10** se logra evidenciar una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante registrada durante 30 días de estudio **(Anexo 16 y 17).** A su vez se observa que, entre los días 15 y 21 se reportó la mayor reducción en el porcentaje de inhibición del DPPH.

Figura 10

Comparación de medias con respecto a la actividad antioxidante en el extracto.

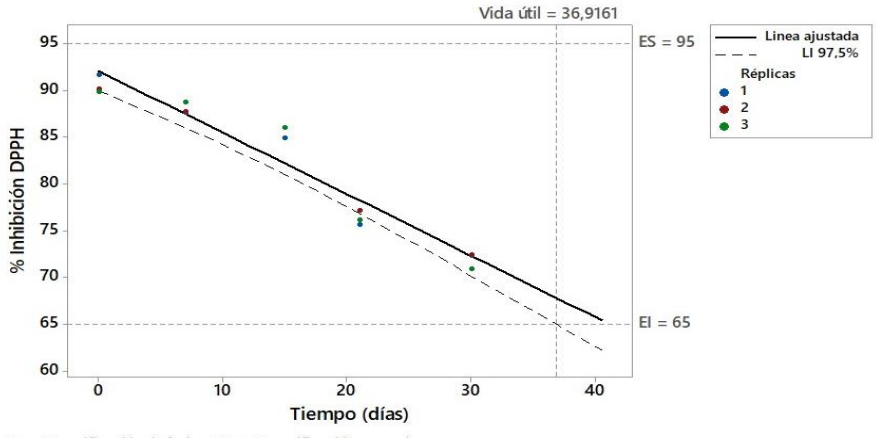


Nota. La comparación de medias se realizó utilizando Tukey, aplicando un nivel de confianza del 95%.

En la **Figura 11** muestra que, de acuerdo con el análisis realizado mediante la herramienta estadística, el extracto de mora evaluado con respecto a la actividad antioxidante presentó una vida útil de 36,916 días. En base a la información mencionada por **Hayes et al. (2019)** se estableció un límite de especificación del 65% para garantizar que la capacidad antioxidante no sea demasiado baja, evitando así que su utilidad en diversas aplicaciones se vea restringida. Asimismo, se fijó un límite de especificación máximo del 95%, considerando que, los compuestos fenólicos aportan de manera significativa a la actividad antioxidante. Es relevante destacar que la disminución de la capacidad antioxidante puede conducir a un aumento en la oxidación de los tejidos, lo que podría tener efectos adversos para la salud debido a la proliferación de radicales libres **(Spigno et al., 2017).**

Figura 11

Pronóstico del tiempo de vida útil del extracto de mora en relación a la actividad antioxidante.



EI = Especificación inferior, ES = Especificación superior
Ecuación para la línea ajustada: % Inhibición DPPH = 92,1 - 0,657 Tiempo (días)

Como se observa en la **Figura 11,** entre los días 15 y 21 la actividad antioxidante del extracto presentó una mayor disminución, siendo acorde con los valores reportados para el contenido de compuestos fenólicos (**Figura 9**). Este hallazgo coincide con lo señalado por **Muflihah et al. (2021)** quienes afirman que, en algunas plantas existe una relación entre el contenido de TPC y la actividad antioxidante. Además, esta disminución moderada durante los 30 días de estudio podría atribuirse por diferentes factores, como la influencia de la temperatura, exposición al oxígeno y las transformaciones químicas naturales que ocurren en el extracto y, en consecuencia, afectando la efectividad del extracto en aplicaciones industriales y de salud **(Nantitanon et al., 2020).**

Para corroborar el tiempo de vida útil determinado mediante la herramienta Minitab Stastical Software, se llevó a cabo un análisis de cinética química. Los resultados indicaron que la degradación de los compuestos fenólicos en el extracto seguía un modelo cinético de primer orden **(Tabla 11),** lo que implica que la velocidad de degradación fue directamente proporcional a la concentración de los compuestos de TPC.

Tabla 11

Coeficiente de determinación de los modelos cinéticos de degradación del extracto.

Orden de reacción	R^2
Orden Cero	0,9835
Primer Orden *	0,9856

Nota. *Mejor coeficiente de determinación para la degradación de compuestos fenólicos.

Para determinar el orden de reacción se compararon los valores R^2 obtenidos para los modelos cinéticos de orden cero y orden 1. Posteriormente, se seleccionó el modelo que mejor se ajustaba a 1, siguiendo la metodología descrita por **Hanuka-Katz et al. (2020**). Con base en el orden de reacción, se calculó la vida útil del extracto aplicando la ecuación correspondiente **(Tabla 7).** La constante de velocidad (k_1) obtuvo un valor de 0,0031 días^{-1}, determinado a partir de la pendiente en la gráfica de reacción de primer orden **(Anexo 18).** Como resultado, en la **Tabla 12** se logra apreciar una vida útil de 33,548 días, periodo en el cual se produce una degradación del 10% en el contenido de compuestos fenólicos del extracto. Este resultado mostró una alta concordancia con el valor obtenido de tiempo de estabilidad para la concentración de TPC por la herramienta estadística Minitab utilizada.

Tabla 12

Tiempo de estabilidad del extracto de mora correspondiente al orden 1.

Lote	Velocidad de reacción k (días^{-1})	Tiempo de vida media (días) $t_{1/2} = \ln 2/k_1$	Tiempo de estabilidad (días) $t_{10\%} = 0{,}104/k_1$
1	0,0031	223,595	33,548

Cabe destacar que, hasta el momento, no se han realizado estudios que determinen la vida útil de extractos provenientes de mora (*Rubus glaucus).* Sin embargo, el resultado obtenido guarda una ligera similitud con el reportado por **Silva et al. (2017)** quienes, al analizar un extracto proveniente de arándano con compuestos fenólicos, refrigerado a 4° C, determinaron una constante de velocidad de 0,0089 días^{-1} y una vida útil de 34,280 días. Por otro lado, **Hanuka-Katz et al. (2020**) identificaron en su estudio una constante de velocidad de 0,27 días^{-1} y un tiempo de vida útil de 10,87 días para un extracto obtenido de fresa con compuestos fenólicos y antocianinas. Este valor fue inferior al del presente estudio, aunque debe considerarse que dicho extracto fue almacenado a 37°C, lo que podría haber acelerado su degradación.

CAPITULO IV.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El extracto con capacidad antioxidante, obtenido a partir de la mora *(Rubus glaucus)* fue evaluado durante un periodo de 30 días. Los resultados mostraron que la concentración de etanol seleccionada provocó una disminución moderada en la capacidad antioxidante inicial del extracto. Esta ligera variación se atribuye a la degradación de los compuestos fenólicos ocurrida durante los diferentes estudios de estabilidad realizados a lo largo del periodo.

- La extracción de compuestos fenólicos proveniente de la mora utilizando etanol al 50% con un tiempo de extracción de 20 minutos (Tratamiento 1) mostró una mayor cantidad de TPC, obteniendo una concentración de 62,594 ± 3,928 mg GAE/ g PS. El análisis estadístico 2^2 indicó que tanto la concentración de etanol como el tiempo de extracción influyen significativamente en la concentración de compuestos fenólicos de esta especie vegetal. Este resultado indica que la mora constituye una fuente natural de TPC y que, al emplear una combinación específica de factores y niveles, es posible optimizar su extracción. Por lo tanto, estas condiciones óptimas son ideales para aplicaciones futuras.

- El extracto de mora con mayor concentración de compuestos fenólicos (62,594 ± 3,928 mg GAE/ g PS) presentó una alta cantidad de actividad antioxidante. A través del ensayo DPPH, logrando inhibir el radical en un 90,544 ± 0,969 %, mientras que su capacidad antioxidante, expresada en equivalentes de Trolox, alcanzó un valor de 161,003 ± 1,896 µmol/g PS. Los resultados indican una correlación directa entre la concentración de compuestos fenólicos y

la actividad antioxidante del extracto, lo que resalta su potencial para su uso en el desarrollo de productos antioxidantes naturales.

- La evaluación de la vida útil del extracto obtenido a partir de la mora abordó diferentes ensayos de estabilidad, entre estos, la determinación de pH, la concentración de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, en donde se pudo determinar que el extracto con actividad antioxidante registró un tiempo de vida útil de 33,654 días, tiempo en el cual se degradó un 10% del contenido de compuestos fenólicos. Además, el estudio cinético realizado evidenció que la degradación de los TPC en el extracto siguió un modelo cinético de primer orden, con una constante de velocidad (k_1) de 0,0031 días $^{-1}$. Estos resultados se lograron al almacenar el extracto en frascos de vidrio tipo ámbar bajo condiciones de refrigeración entre 2 a 8°C durante 30 días.

4.2. Recomendaciones

- Además del fruto, se podría aprovechar las hojas y las raíces de la planta de mora para la extracción de compuestos fenólicos, ya que estas partes pueden constituir una fuente complementaria de compuestos bioactivos.

- Utilizar metanol como disolvente en el proceso de extracción para evaluar si el método de extracción asistida por ultrasonido permite obtener un mayor rendimiento de contenido fenólico.

- Realizar un análisis mediante cromatografía HPLC para identificar las variedades de compuestos fenólicos presentes en el extracto y evaluar cuales contribuyen de manera significativa a la actividad antioxidante.

- Incluir un análisis microbiológico en el estudio de estabilidad para identificar posibles factores adicionales que puedan influir en la vida útil del extracto.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

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*, 12(2), 245. https://doi.org/10.3390/antiox12020245

Acosta, J., Salomón, S., Sevilla, I., y Nuevas Paz, L. (2016). Use of ultrasound for the extraction of the nonpolar fraction in leaves of Mangifera indica L. (mango tree). *Cuban Journal of Medicinal Plants*, 21(3), 261-271.

Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M., y Castro, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (Rubus adenotrichus Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4), 1497-1501. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032

Amariles, P. A. (2022). Minimum daily consumption of 400 grams of fruits and vegetables - principle and goal of healthy eating and cardiovascular health. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 63(1), 6-10. https://dx.doi.org/10.30827/ars.v63i1.23070

Aguirre L., Cubillos L., Tarazona M., y Rodríguez, L. (2019). Effect of treatment and storage time on the functional compounds of blackberry and strawberry by-products. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1), 2-10. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.034

Auquiñivin, E. A., y Paucar Menacho, L. M. (2020). Comparative study of the physicochemical characteristics and shelf life of native papayas, "papayita de monte" (Carica pubescens Lenné & K. Koch) and "babaco" (Carica pentagona Heilborn) dehydrated by lyophilization. *Arnaldoa*, *27*(1), 115-128. http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27105

Barrientos L, A., Arvizu L, D., Salcedo E, F., Villanueva R, S., Vargas C, J., Barradas, B., y López, P, M. (2019). Polyphenol content and antioxidant capacity of Physalis chenopodifolia Lam. wild and cultivated. *Mexican journal of forestry sciences*, 10(51), 182-200. https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i51.323

Blair, G., y Olivares, L. M. (2014). Polyphenolic content in products made from blackberry (Rubus glaucus, Benth) and aromatic plants. *Revista de Investigaciones de UNIAGRARIA*, 2(1), 99-110. https://revistas.uniagraria.edu.co/index.php/riu/article/view/77

Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., y Patil, R. T. (2016). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food research international*, 44(1), 391-396. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.001

Bagherian, H., Ashtiani, F. Z., Fouladitajar, A., y Mohtashamy, M. (2015). Comparisons between conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical engineering and processing: Process Intensification*, 50(11-12), 1237-1243. https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.08.002

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín, M. R., y 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

Borrego, C. (2018). Evolution of compounds of biological interest in blackberries throughout fruit ripening (Master's thesis). http://hdl.handle.net/10498/21185

Blum, P. S. (2007). *Cinética Química Departamento de Fisico-Química.* Lima: UNAM.

Chávez, R. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. *Phenolic Compounds-Biological Activity*, 8(2), 54-79. http://dx.doi.org/10.5772/66885

Chethan, S., y Malleshi, N. G. (2017). Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food chemistry*, 105(2), 862-870. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.012

Cao, Y., y Xiong, Y. L. (2017). Interaction of whey proteins with phenolic derivatives under neutral and acidic pH conditions. *Journal of Food Science*, 82(2), 409-419. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13607

Culque Lezama, J. S., y Urbina Quiñonez, R. L. (2023). Effect of pasteurization temperature on anthocyanins and shelf life of cranberry nectar *(Vaccinium myrtillus).* https://hdl.handle.net/20.500.14278/4438

Cucullu, A. F., Lee, L. S., Robertson, J. A., Franz, A. O., y Goldblatt, L. A. (2019). Determination of aflatoxins in agricultural products: Use of aqueous acetone for extraction. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 49(3), 554-562. https://doi.org/10.1093/jaoac/49.3.554

Díaz-Hung, M. L., y González Fraguela, M. E. (2014). El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia?. *Neurología*, 29(8), 451–452. doi:10.1016/j.nrl.2013.06.022

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. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-12- stability-testing-new-drug-substances-and-products-step-5_en.pdf

Esparza, I., Cimminelli, M. J., Moler, J. A., Jiménez, N., y Ancín, C. (2020). Stability of phenolic compounds in grape stem extracts. *Antioxidants,* 2020, 9 (8), 2-16. https://doi.org/10.3390/antiox9080720

Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Álvarez, J. A., F. Barbero, G., y Ayuso, J. (2019). Extraction of Antioxidants from Blackberry (Rubus ulmifolius L.): Comparison between Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction Techniques. *Agronomy*, 9(11), 74-77. https://doi.org/10.3390/agronomy9110745

Estupiñán, D. C., Schwartz, S. J., y Garzón, G. A. (2011). Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (Rubus glaucus Benth) anthocyanin powder. *Journal of food science*, 76(1), 26-34. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01935.x

Friedman, M., y Jürgens, H. S. (2020). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2101-2110. https://doi.org/10.1021/jf990489j

Figueroa, R., Tamayo, J., González, S., Moreno, G., y Vargas, L. (2019). Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (Hylocereus undatus*). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1), 44-50. https://www.redalyc.org/pdf/813/81318808007.pdf

Gan, A., y Baroutian, S. (2022). Subcritical water extraction for recovery of phenolics and fucoidan from New Zealand Wakame (Undaria pinnatifida) seaweed. *The Journal of Supercritical Fluids,* 190, 10-15. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105732

Gasmi, A., Mujawdiya, P. K., Noor, S., Lysiuk, R., Darmohray, R., Piscopo, S., y Bjørklund, G. (2022). Polyphenols in metabolic diseases. *Molecules,* 27(19), 62-70. https://doi.org/10.3390/molecules27196280

Garzón, G. A., Riedl, K. M., y Schwartz, S. J. (2022). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (Rubus glaucus Benth). *Journal of food science*, 74(3), 227-232. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01092.x

Grande-Tovar, C., Araujo-Pabón, L., Flórez-López, E., y Aranaga-Arias, C. (2021). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (Rubus glaucus Benth). *Informador Técnico*, *85*(1), 64-82. https://doi.org/10.23850/22565035.2932

Guerrero, A. J. (2020). La biodiversidad de los alimentos ecuatorianos: fuente de salud y riqueza potencial. *Revista Científica Ecuador es Calidad*, 2(2), 12-15. https://revistaecuadorescalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorescalidad/index.php/revista/article/view/47

Guerra, H. G., y Corzo, L. V. (2023). P128/S3-P1 Reaction kinetics of antioxidant compounds of Rubus Sparsiflorus (Shiraca) leaves and free radicals. *Latin American Archives of Nutrition*, 73, 101-136. https://doi.org/10.37527/2023.73.S1

Gordillo, J. C., Ortiz, D., Larrahondo, J. E., Mejía, M. S., y Pachon, H. (2012). Antioxidant activity in soursop (Annona muricata l.): a literature review. *Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants*, 11(2), 111-126. https://www.redalyc.org/pdf/856/85622734002.pdf

Hara, K., Someya, T., Sano, K., Sagane, Y., Watanabe, T., y Wijesekara, R. G. S. (2018). Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data in brief*, 17, 870-875. https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.02.013

Hanuka-Katz, I., Eran-Nagar, E., Okun, Z., y Shpigelman, A. (2020). The link between polyphenol structure, antioxidant capacity and shelf-life stability in the presence of fructose and ascorbic acid. *Molecules*, 25(1), 22-25. https://doi.org/10.3390/molecules25010225

Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O'grady, M. N., y Kerry, J. P. (2019). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (Olea europaea L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948-955. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.092

Hidalgo, G. I., y Almajano, M. P. (2017). Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants*, 6(1), 7-15. https://doi.org/10.3390/antiox6010007

Iza, F., Rojas-Lema, X., y Argüello, Y. (2016). Línea base de la calidad de la mora de Castilla (Rubus glaucus) en su cadena alimentaria. *Enfoque UTE, 7*(3), 82-94.

Isaza, S. P., y Jaramillo, M. A. (2020). *Antioxidant activity in blackberry and avocado by-products; Preliminary identification of its potential in the development of ingredients with industrial applications*. http://hdl.handle.net/10946/4501

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2010). INEN 2427:2010. Frutas frescas, Mora, Requisitos. https://archive.org/details/ec.nte.2427.2010/page/n3/mode/2up

Jamanca, N. C. (2017). *Antioxidantes en los alimentos.* Lima: UNAB.

Jadid, N., Hidayati, D., Hartanti, S. R., Arraniry, B. A., Rachman, R. Y., y Wikanta, W. (2019). Antioxidant activities of different solvent extracts of Piper retrofractum Vahl. using DPPH assay. *In AIP conference proceedings.* https://doi.org/10.1063/1.4985410

Jácome, W. E. (2023). Producción de mora, un potencial en Tungurahua. Diario La Hora, págs. 2-3.

Jiménez-Morales, K., Castañeda-Pérez, E., Herrera-Pool, E., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J. C., García-Cruz, U., Pech-Cohuo, S. C., y Pacheco, N. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Different Maturity Stages and Fruit Parts of Cordia dodecandra. *Agriculture*, 12(12), 21-27. https://doi.org/10.3390/agriculture12122127

Karaklajic L, Z., Tomic T, J., Pesakovic, M., Paunovic, S. M., Stampar R, F., Mikulic, M., y Jakopic, J. (2023). Black Queens of Fruits: Chemical Composition of Blackberry (Rubus subg. rubus Watson) and Black Currant (Ribes nigrum L.) Cultivars Selected in Serbia. *Alimentos*, 12(14), 2775. https://doi.org/10.3390/foods12142775

Kim, S., Asnin, L., Assefa, A., Ko, E., Sharma, K., y Park, S. (2014). Extraction of antioxidants from aloe vera leaf gel: a response surface methodological study. *Food analytical methods*, 7, 1804–1815. https://doi.org/10.1007/s12161-014-9822-x

Lozano-Estevan, M., Córdoba-Díaz, D., y Córdoba, M. (2012). *Manual de tecnología farmacéutica*. https://produccioncientifica.ucm.es/documentos/63eed8c90094040479fbf440

Martins, M. S., Gonçalves, A. C., Alves, G., y Silva, L. R. (2023). Blackberries and blackberries: Berries with important health-promoting properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12024. https://doi.org/10.3390/ijms241512024

Matei, P. L., Deleanu, I., Brezoiu, A. M., Chira, N. A., Busuioc, C., Isopencu, G., Cîlțea-Udrescu, M., Alexandrescu, E., y Stoica-Guzun, A. (2023). Ultrasound-Assisted Extraction of Blackberry Seed Oil: Optimization and Oil Characterization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(6), 24-36. https://doi.org/10.3390/molecules28062486

Martínez, N., Vidal, D. M., y Lahuerta, J. M. (2008). The bioactive compounds in fruits and their effects on health. *Dietary Activity*, 12(2), 64-68. https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2

Malpica-Acosta, S. B., Acosta-Osorio, A. A., Benedito-Fort, J. J., y Castillo-Zamudio, R. I. (2024). Efecto de tres métodos de extracción en el rendimiento, actividad antioxidante, fenoles totales y estabilidad de extractos de hojas de Plectranthus amboinicus. *CienciaUAT*, 68(4), 91-106. https://doi.org/10.29059/cienciauat.v18i2.1797

Memete, A. R., Sărac, I., Teusdea, A. C., Budău, R., Bei, M., y Vicas, S. I. (2023). Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Several Blackberry (Rubus spp.) Fruits Cultivars Grown in Romania. *Horticulturae,* 9(5), 556. https://doi.org/10.3390/horticulturae9050556

Medina, A. A. (2023). Tungurahua produce el 60% de la mora a nivel nacional. *El Diario La Nación,* págs. 1-5.

Metzner, C. R., Lupitu, A. I., Moisa, C., Rivis, A., Copolovici, L. O., y Poiana, M. A. (2020). Investigation on high-value bioactive compounds and antioxidant properties of blackberries and their fractions obtained by home-scale juice processing. *Sustainability,* 12(14), 56-81. https://doi.org/10.3390/su12145681

Moreno, B. L., Casierra, F., y Medina, O. J. (2023). Perfil Fenólico y Capacidad Antioxidante de Frutos de Mora *(Rubus spp*) Cultivados en Colombia. *Erwerbs-Obstbau,* 65(4), 1047-1056.

Mindola, P. E. (2021). Elaboración de néctares de pera, durazno y manzana utilizando como agente conservante extractos acuosos obtenidos de canela (Cinnamomum verum). *Revista de Ciencias,* 25(1) 54-59. https://doi.org/10.25100/rc.v25i1.11579

Murillo, P. M., Mendoza, J. G., y Alcívar, S. S. (2023). Nectar based on dragon fruit (Hylocereus undatus) with passion fruit peel flour (Passiflora edulis flavicarpa): Antioxidant compounds, physicochemical stability and sensory acceptability. *Clinical Nutrition and Hospital Dietetics,* 43(3), 88-102. https://doi.org/10.12873/433munoz

Munteanu, I. G., y Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International journal of molecular sciences,* 22(7), 33-40. https://doi.org/10.3390/ijms22073380

Muflihah, Y. M., Gollavelli, G., y Ling, Y. C. (2021). Correlation study of antioxidant activity with phenolic and flavonoid compounds in 12 Indonesian indigenous herbs. *Antioxidants,* 10(10), 15-30. https://doi.org/10.3390/antiox10101530

Naspud-Rojas, M. E. (2018). Determination of the antioxidant capacity of the alcoholic extracts of the blackberry fruit (Rubus glaucus Benth) obtained with three thermal pretreatments (Bachelor's thesis).

Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., y Okonogi, S. (2020). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT-Food Science and Technology,* 43(7), 1095-1103. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.015

Omar, G., Abdallah, L., Barakat, A., Othman, R., y Bourinee, H. (2021). In vitro haemostatic efficacy of aqueous, methanol and ethanol plant extracts of three medicinal plant species in Palestine. *Brazilian Journal of Biology,* 80(4), 763-768. https://doi.org/10.1590/1519-6984.219186

Paredes, A., Peche, J., y León, N. (2019). Índice de carotenoides de pimiento morrón (Capsicum annuum) basado en la medición de color, utilizando imágenes hyperespectrales y digitales. *Scientia Agropecuaria*, 93, 531-539. https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.10

Pérez-Cabeza, S. B., Angarita, N. M., Cervantes, M., y Barón-Rodríguez, M. A. (2018). Evaluation of antioxidant potential in a spinach extract by cyclic voltammetry. *Revista ION,* 30(2), 99-105. http://dx.doi.org/10.18273/revion.v30n2-2017009

Pacheco-Coello, F., Bermúdez-Fernández, N., y Blanco-Altuve, M. (2020). Compuestos fenólicos e inhibición del estrés oxidativo de un extracto metanólico de semilla de aguacate (Persea americana Mill). *Ab Intus*, 6, 68-74. http://www.ayv.unrc.edu.ar/ojs/index.php/Ab_Intus/article/view/55

Reina A, C., Rincón I, M., y Erazo, A. B. (1998). Manejo Postcosecha y Evaluación de la Calidad para la Mora de Castilla (Rubus glaucus) que se Comercializa en la Ciudad de Neiva. Bogotá: Litociencia.

Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlafi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. B., y Uddin, M. S. (2021). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules (Basel, Switzerland),* 27(1), 23-31. https://doi.org/10.3390/molecules27010233

Ramón, C., y Garzón, M. A. (2021). Efecto de los parámetros de operación de la extracción asistida por ultrasonido en la obtención de polifenoles de mora: una revisión. *Tecnológicas,* 24(51), 18-22. https://doi.org/10.22430/22565337.1822

Reyes-Carmona, J., Yousef, G. G., Martínez-Peniche, R. A., y Lila, M. A. (2021). Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (Rubus sp.) produced in different climatic regions. *Journal of food science*, 70(7), 497-503. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11498.x

Rice-Evans, C., Miller, N., y Paganga, G. (2020). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159. https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0010

Rodríguez E, G., Valenzuela S, L., Vargas, H., Grifaldo, P. F., Meza, D., Camberos, C., y Canseco, N. G. (2023). The importance of blackberry (Rubus spp.) production in Mexico. *Agro Productivity*, 19(1), 43-65. https://doi.org/10.32854/agrop.v16i10.2531

Robinson, J. A., Bierwirth, J. E., Greenspan, P., y Pegg, R. B. (2020). Polifenoles de mora: revisión de la composición, la cantidad y los impactos en la salud de los estudios in vitro e in vivo. *Revista de Bioactivos Alimentarios*, 9(1), 26-43. https://doi.org/10.31665/JFB.2020.9217

Rodríguez, E. A., González, V. L., Sierra, R. D., Vicente, R., Morales, C. L., y Marrero, D. (2015). Estabilidad de lotes piloto de D-004 ingrediente activo en frascos de vidrio ámbar. Revista CENIC. *Ciencias Químicas*, 46, 112-115.

Rojas-Llanes, J. P., Martínez, J. R., y Stashenko, E. E. (2014). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity of blackberry (Rubus glaucus Benth) extracts obtained under different conditions. *Vitae*, 21(3), 218-227.

Samaniego, I., Brito, B., Viera, W., Cabrera, A., Llerena, W., Kannangara, T., y Carrillo, W. (2020). Influence of the maturity stage on the phytochemical composition and the antioxidant activity of four Andean blackberry cultivars (Rubus glaucus Benth) from Ecuador. *Plants*, 9(8), 10-27. https://doi.org/10.3390/plants9081027

Sánchez, D. E. (2012). *Estudio del potencial antioxidante de la mora (Rubus glaucus Benth) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento.* Bogotá: UNAL.

Sánchez, L., Real, V., y Perez, Y. (2013). Variables Determining the commercial maturity of Castilla blackberry (Rubus glaucus BENTH). *Scientia Agroalimentaria*, 33(2), 12-15. https://repository.ut.edu.co/handle/001/1322

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., y Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. https://doi.org/10.3390/molecules24081583

Sik, B., Ajtony, Z., Lakatos, E., y Székelyhidi, R. (2024). Wild Blackberry Fruit (Rubus fruticosus L.) as Potential Functional Ingredient in Food: Ultrasound-Assisted Extraction Optimization, Ripening Period Evaluation, Application in Muffin, and Consumer Acceptance. *Foods*, 13(5), 6-13. https://doi.org/10.3390/foods13050666

Sepúlveda, C. T., y Zapata, J. E. (2019). Efecto de la Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de Bixa orellana L. *Información tecnológica*, *30*(5), 57-66. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000500057

Silva, V. L., Silva, A. C., Costa-Lima, B. R., Carneiro, C. S., y Conte-Junior, C. A. (2017). Stability of polyphenols from blueberry (Vaccinium corymbosum L.) in fermented dairy beverage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), 33-45. https://doi.org/10.1111/jfpp.13305

Spigno, G., Tramelli, L., y De Faveri, D. M. (2017). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021

Suter, C. M. (2019). Relationships between the Structure and the Bactericidal Properties of Phenols. *Chemical Reviews*, 28(2), 269-279. https://doi.org/10.1021/cr60090a004

Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., del Barrio, G., Lobo, A. P., y Parra, F. (2020). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food chemistry*, 120(1), 339-342. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.073

Llorente, E., Calmarza, P., Montolio, S., Bravo, A., Pozo, A., Sánchez, J. J., Vaquer, J. M., Camps Andreu, J., Sáez Tormo, G., y Fort Gallifa, I. (2022). Implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y posibles terapias antioxidantes. *Advances in Laboratory Medicine*, 3(4), 351–360. https://doi.org/10.1515/almed-2022-0022

Tran, C. H., Nghiem, M. T., Dinh, A. M. T., Dang, T. T. N., Van Do, T. T., Chu, T. N., Mai, T. H., y Phan, V. M. (2023). Optimization Conditions of Ultrasound-Assisted Extraction for Phenolic

Compounds and Antioxidant Activity from Rubus alceifolius Poir Leaves. *International journal of food science,* 20 (3), 75-79. https://doi.org/10.1155/2023/7576179

Triggiani, D., y Franconi, R. (2022). Rubus ulmifolius: traditional, current and future pharmaceutical uses. *Current Traditional Medicine,* 4(3), 192-203. https://doi.org/10.2174/2215083804666181017152405

Torrenegra, M. E., Granados, C., Osorio, M. R., y León, G. (2015). Comparison of Microwave Radiation-Assisted Hydro-distillation (MWHD) with Conventional Hydro-distillation (HD) in the Extraction of Essential Oil from Minthostachys mollis. *Information technology*, 26(1), 117-122. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000100013

Torres-Medina, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., y Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. Agronomy, 7(3), 47. https://doi.org/10.3390/agronomy7030047

Tyman, J. H. (1996). *Synthetic and natural phenols.* Ámsterdam, The Netherlands: Elsevier.

Vázquez-Vázquez, J., Barajas-Salazar, M., Casas-Godoy, L., Alcázar-Valle, M., Arellano-García, L., y Barrera-Martínez, I. (2024). Enhanced extraction of antioxidant phenolics: Quercetin, Kaempferol, Gallic Acid, Syringic Acid, and Epicatechin from fresh berries and their waste using Ultra-Turrax and Ultrasonication. *Applied Food Research*, 4(2), 10-13. https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100539

Vergara, D. R., Salazar, A. M., Cornejo, V., Andrews, M., Agüero, S. D., y Leal-Witt, M. J. (2021). Alimentos ultraprocesados y su relación con la obesidad y otras enfermedades crónicas no transmisibles: una revisión sistemática. *Rev Esp Nutr Comunitaria,* 27(3), 214-222.

Vélez, J. P., Henao, C. C., Hurtado, N. C., y Álvarez, G. E. (2022). Determination of the antioxidant activity of agricultural waste from pruning blackberry crops Rubus glaucus benth with and without thorn. *Transdisciplinary Science in the New Age,* 215, 51-77. https://doi.org/10.5281/zenodo.7381757

Viada, E., Gómez, L., y Campaña, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *Correo científico médico,* 21(1), 171-186. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109049

Vega, N. A., Castillo, D. C., y Moreno, D. B. (2024). Antimicrobial effect of polyphenolic extracts present in ananas comosus. *Engineering and Competitiveness*, 26(2), 76-81. https://doi.org/10.25100/iyc.v26i2.14003

Wang, Y., Yang, M., Lee, S. G., Davis, C. G., Koo, S. I., y Chun, O. K. (2012). Dietary total antioxidant capacity is associated with diet and plasma antioxidant status in healthy young adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(10), 1626-1635. https://doi.org/10.1016/j.jand.2012.06.007, 2-s

World Health Organization. (2019). *Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades.* https://www.who.int/nmh/countries/ecu_en.pdf?Ua=1

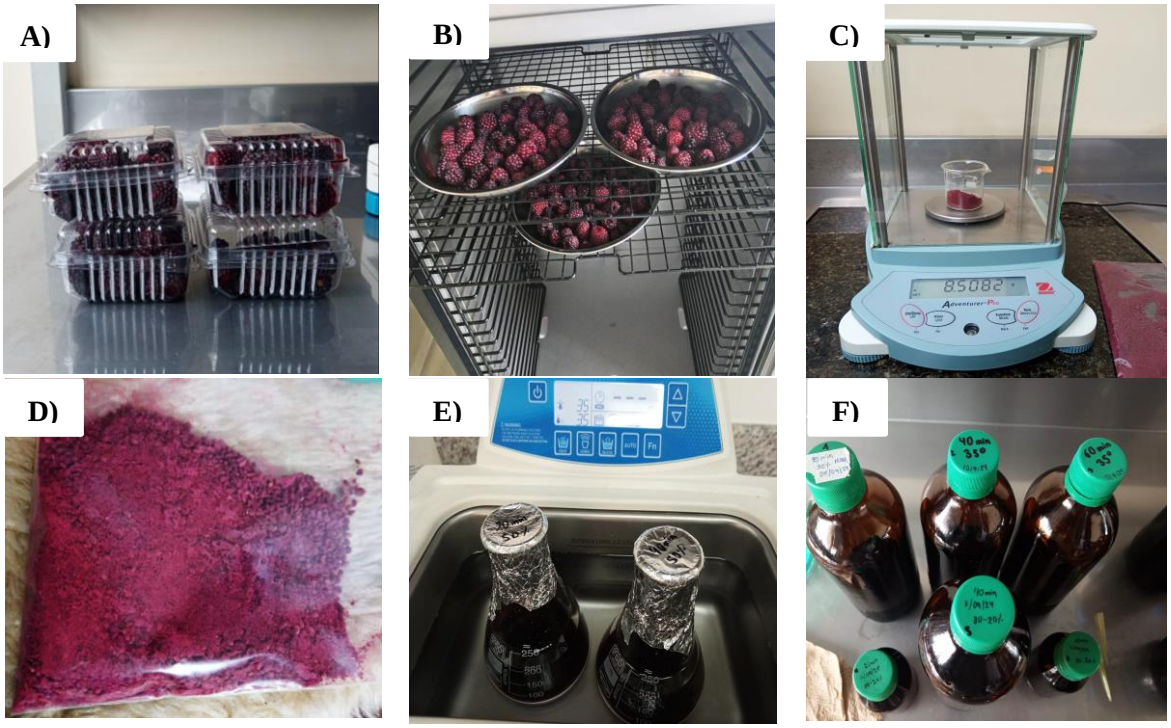
Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., y Wozniak, L. A. (2020). A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry*, 17(28), 3262-3288. https://doi.org/10.2174/092986710792231950

Zhao, H., Wu, Y., Wu, W., Li, W., y Jin, Y. (2023). Selection and evaluation of excellent blackberry cultivars and strains based on nutritional quality, antioxidant properties and genetic diversity. *Plants*, 12(16), 29-32. https://doi.org/10.3390/plants12162982

ANEXOS

Anexo 1

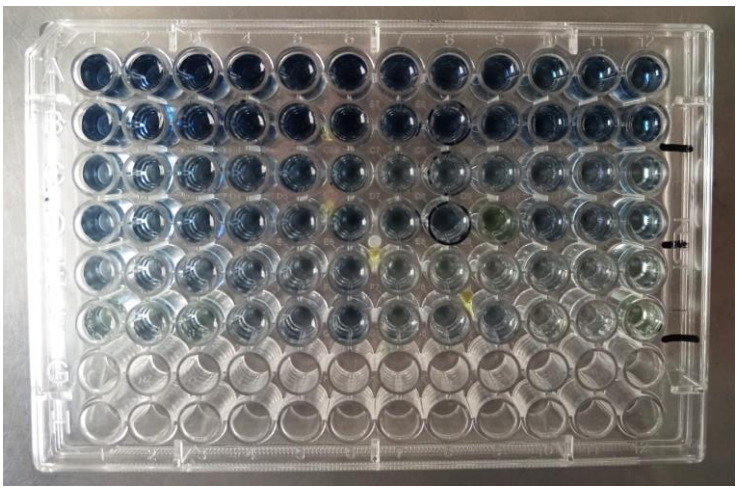
Proceso de obtención de compuestos fenólicos de la mora.



Nota. Obtención de extractos con compuestos fenólicos de la mora *(Rubus glaucus).* A) Almacenamiento de la mora. B) Deshidratación de la mora. C) Trituración y pesaje del material vegetal. D) Materia vegetal seca. E) Extracción de fenoles totales mediante baño ultrasónico. F) Almacenamiento del extracto obtenido.

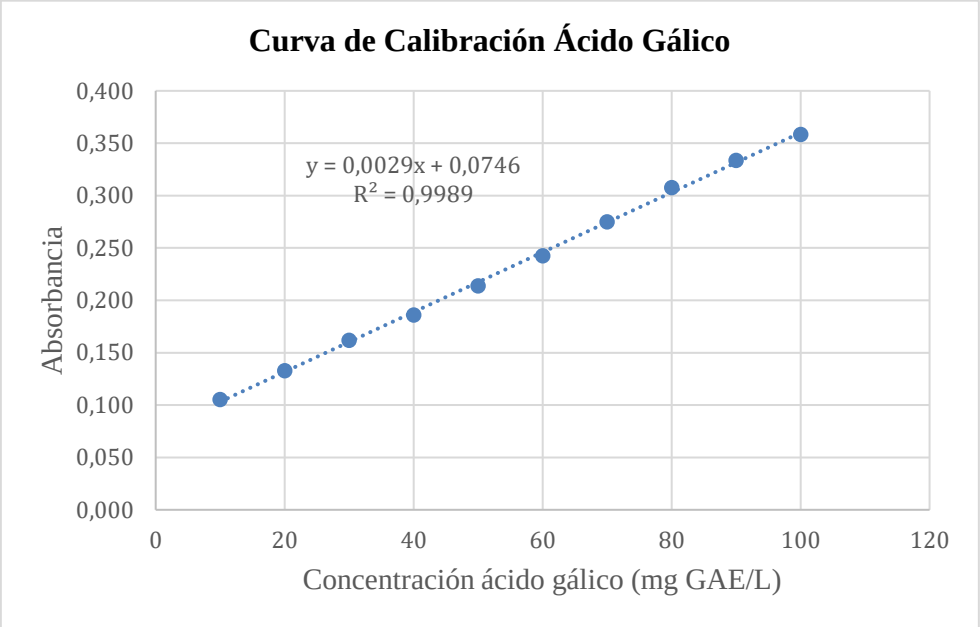
Anexo 2

Placa de 96 micro pocillos en la determinación de compuestos fenólicos mediante el método Folin-Ciocalteu.



Anexo 3

Curva de calibración de ácido gálico (10 a 100 µL).



Anexo 4

Cuantificación de compuestos fenólicos en cada tratamiento por triplicado.

Tratamiento	Compuestos fenólicos totales (TPC) (mg GAE/g PS)				Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
	R1	R2	R3	Promedio		
T1	58,058	64,862	644,862	62,594	3,928	6,276
T2	36,135	37,395	39,663	37,731	1,788	4,738
T3	47,475	47,979	49,995	48,483	1,333	2,750
T4	26,308	27,568	29,332	27,736	1,519	5,477

Anexo 5

Cálculo demostrativo de la cuantificación fenólica del Tratamiento 1.

$$TPC = \frac{Abs - b}{m} * FD * \frac{V_{extF}}{m_0}$$

$$TPC = \frac{0{,}305 - 0{,}0746}{0{,}0029} * 25 * \frac{0{,}190}{6{,}5}$$

$$TPC = 58{,}058$$

Anexo 6

Tabla de ANOVA de la cuantificación fenólica procedente de la mora a través de un diseño 2^2.

Análisis de Varianza

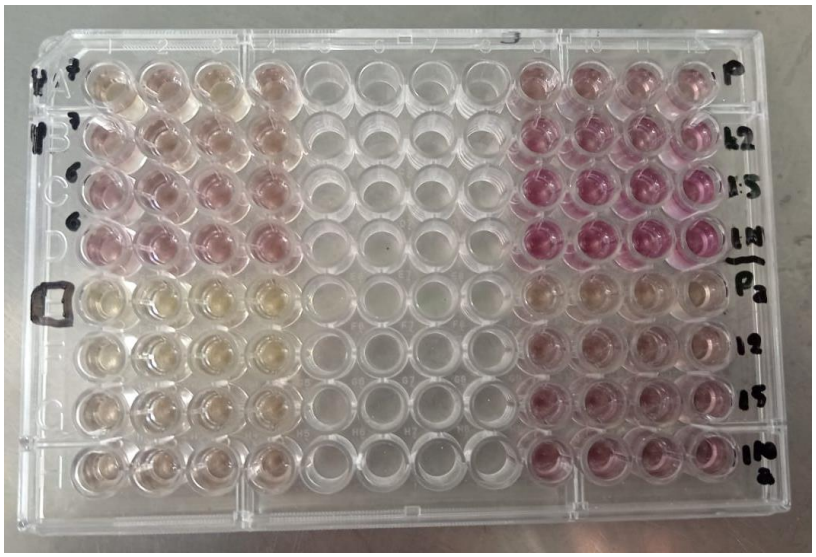
Fuente	GL	SC Ajustados	MC Ajustados	Valor F	Valor p
Modelo	3	2008,73	669,58	117,92	0,000
Lineal	2	1996,03	998,01	175,76	0,000
Concentración de etanol	1	1560,20	1560,20	274,77	0,000
Tiempo de extracción	1	435,82	435,82	76,75	0,000
Interacciones de 2 términos	1	12,71	12,71	2,24	0,173
Concentración de etanol*Tiempo de extracción	1	12,71	12,71	2,24	0,173
Error	8	45,43	5,68		
Total	11	2054,16			

Nota. GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Cuadrados medios.

R-cuadrado: 97,79%; **R-cuadrado (ajustado):** 96,96%; **R-cuadrado (predecible):** 95,02%

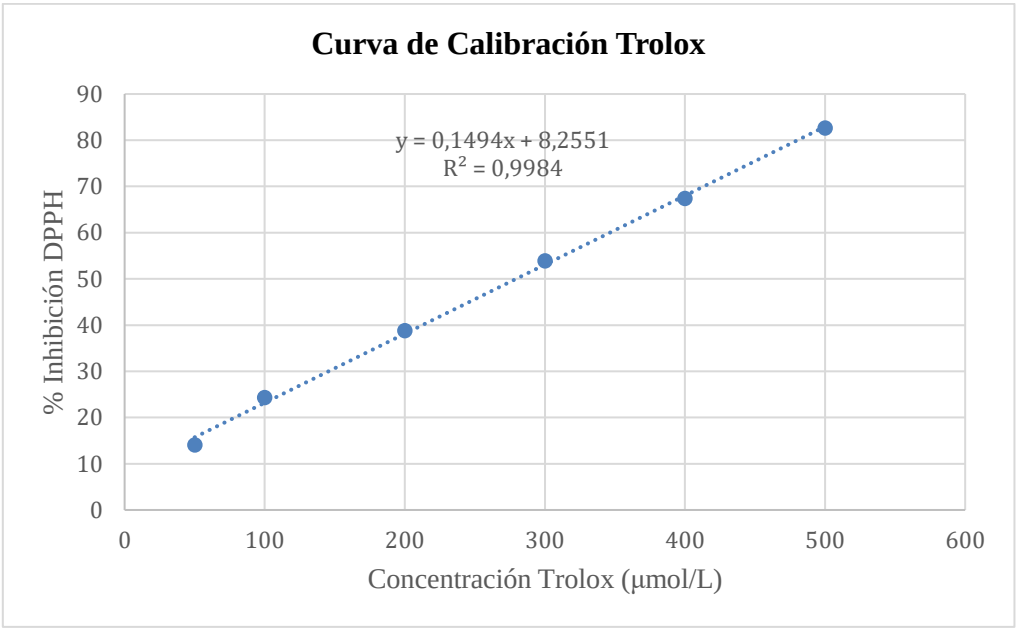
Anexo 7

Placa de 96 micro pocillos en la determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH.



Anexo 8

Curva de calibración de Trolox (50 a 500 µmol/L).



Anexo 9

Cálculo demostrativo del porcentaje de inhibición del radical de DPPH.

$$\%\ de\ inhibición = \left[1 - \left(\frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{control} - A_{blsnco}}\right)\right] * 100$$

$$\%\ de\ inhibición = \left[1 - \left(\frac{0{,}090 - 0{,}057}{0{,}448 - 0{,}057}\right)\right] * 100$$

$$\%\ de\ inhibición = 91{,}654$$

Anexo 10

Determinación de la actividad antioxidante del tratamiento con mayor contenido fenólico.

Tratamiento 1

(concentración de etanol 50% y tiempo de extracción 20 minutos)

Réplica	Absorbancia	% Inhibición de DPPH	µmol Eq. Trolox/g PS
R1	0,090	91,654	163,173
R2	0,096	90,118	160,168
R3	0,097	89,862	159,667
Promedio	0,094 ± 0,004	90,544 ± 0,969	161,003 ± 1,896

Nota. Los resultados obtenidos son expresados como media ± desviación estándar.

Anexo 11

Evaluación del pH del extracto proveniente de la mora.



Anexo 12

Resumen estadístico de pH en el extracto de mora durante 30 días.

Tiempo (días)	Réplicas	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)	Intervalo de confianza (IC) de 95%
0	3	4,27667	0,01528	0,3572	(4,22394; 4,32939)
7	3	4,3900	0,0361	0,8223	(4,3373; 4,4427)
15	3	4,6300	0,0200	0,4319	(4,5773; 4,6827)
21	3	4,9633	0,0764	1,5392	(4,9106; 5,0161)
30	3	5,0733	0,0252	0,4967	(5,0206; 5,1261)

Anexo 13

ANOVA del pH registrado en el extracto de mora durante 30 días.

Fuente	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (MC)	Valor F	Valor p
Tiempo (días)	4	1,45013	0,362533	215,79	0,000
Error	10	0,01680	0,001680		
Total	14	1,46693			

Nota. Se utilizó un nivel de confianza de 95%.

Anexo 14

Resumen estadístico del contenido fenólico en el extracto de mora durante 30 días.

Tiempo (días)	Réplicas	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)	Intervalo de confianza (IC) de 95%
0	3	63,686	1,433	2,2501	(62,436; 64,936)
7	3	56,798	1,008	1,7747	(55,548; 58,048)
15	3	50,919	0,770	1,5122	(49,669; 52,169)
21	3	41,343	0,885	2,1406	(40,093; 42,593)
30	3	36,471	0,525	1,4394	(35,221; 37,721)

Anexo 15

ANOVA del contenido fenólico en el extracto de mora durante 30 días.

Fuente	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (MC)	Valor F	Valor p
Tiempo (días)	4	1476,66	369,164	391,03	0,000
Error	10	9,44	0,944		
Total	14	1486,10			

Nota. Se utilizó un nivel de confianza de 95%.

Anexo 16

Resumen estadístico de la actividad antioxidante en el extracto de mora durante 30 días.

Tiempo (días)	Réplicas	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)	Intervalo de confianza (IC) de 95%
0	3	90,545	0,969	1,0701	(89,537; 91,553)
7	3	88,041	0,619	0,7030	(87,033; 89,049)
15	3	85,617	0,652	0,7615	(84,609; 86,625)
21	3	76,340	0,764	1,0007	(75,332; 77,348)
30	3	71,916	0,860	1,1958	(70,908; 72,924)

Anexo 17

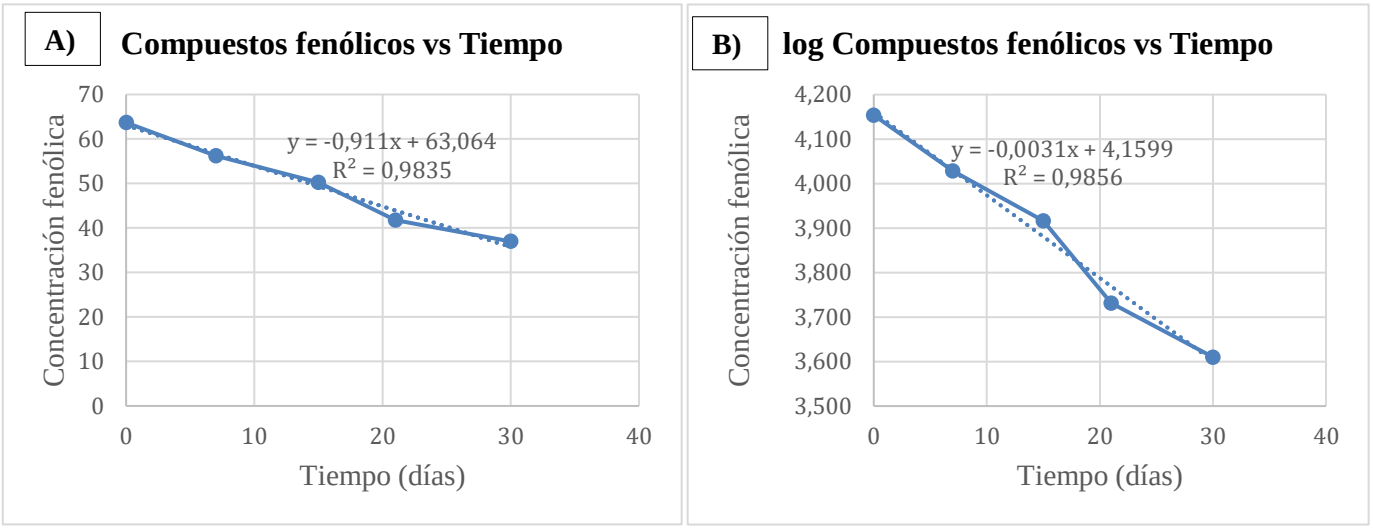
ANOVA de la actividad antioxidante en el extracto de mora durante 30 días.

Fuente	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (MC)	Valor F	Valor p
Tiempo (días)	4	765,311	191,328	311,56	0,000
Error	10	6,141	0,614		
Total	14	771,452			

Nota. Se utilizó un nivel de confianza de 95%.

Anexo 18

Gráficas de orden de reacción obtenido a partir de la mora.



Nota. A) Gráfica de orden cero; B) Gráfica de primer orden.