

Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus Benth*)

Determination of the antioxidant and antimicrobial activity of blackberry residues (*Rubus glaucus Benth*)

Carlos David Grande-Tovar¹
Carlos Andrés Aranaga-Arias²
Edwin Flórez-López²
Liza María Araujo-Pabón⁴

¹ Universidad del Atlántico (Colombia). Correo electrónico: carlosgrande@mail.uniatlantico.edu.co
orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6243-4571>

² Universidad Santiago de Cali (Colombia). Correo electrónico: carlos.aranaga00@usc.edu.co
orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1806-657X>

³ Universidad Santiago de Cali (Colombia). Correo electrónico: Edwin.florez00@usc.edu.co
orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6312-7568>

⁴ Universidad Santiago de Cali (Colombia). Correo electrónico: lisis.94@hotmail.com

Recibido: 01-07-2020 Aceptado: 13-11-2020

Cómo citar: Grande-Tovar, Carlos; Aranaga-Arias, Carlos; Flórez-López, Edwin; Araujo-Pabón, Liza (2020). 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>

Resumen

El procesamiento de frutas y verduras genera alrededor de 1,3 billones de toneladas por año de residuos a lo largo de toda la cadena de producción. Con el propósito de agregar valor a los residuos de mora provenientes de una despulpadora de un mercado local, se determinó la capacidad antioxidante y antibacteriana con tres cepas de bacterias. Los residuos presentaron una alta cantidad de la antocianina cianidina-3-rutinosido (2520 mg/kg de muestra) mediante el análisis del sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), una acidez titulable de 1,28 %, un pH ácido 3,23 y un contenido de cenizas de 0,45 %. El extracto hidrometanólico 80:20 % (v/v) presentó la mayor capacidad antioxidante por el método DPPH (40,53 μ mol equivalente trolox, TE), mientras que el extracto liofilizado mostró la mayor capacidad antioxidante por el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (60,31 μ mol equivalente trolox, TE). La actividad antibacteriana dependió de la cantidad del extracto hidrometanólico y del tipo de cepa (las Gram positivas fueron más sensibles), siendo *S. aureus* la bacteria más sensible (15,3 mm a 8 mg/mL de extracto). *S. aureus* y *E. coli* presentaron una sensibilidad alta respecto a la concentración mínima inhibitoria (MCI) (3 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente).

Palabras clave: ABTS, alimentos nutraceuticos, aprovechamiento de residuos, DPPH, residuos de mora.

Abstract

Fruit and vegetable production generate around 1.3 billion tons per year of waste throughout the entire production chain. To add value to blackberry residues, the antioxidant and antibacterial capacity was determined with three strains of bacteria. The residues showed a high amount of the anthocyanin cyanidin-3-rutinoside (2520 mg/kg of the sample) by UHPLC analysis, titratable acidity of 1.28 %, an acidic pH 3.23, and a content of ashes of 0.45 %. The 80:20 % (v/v) hydromethanolic extract presented the highest antioxidant capacity

by the DPPH method (40.53 μmol Trolox equivalents, TE), while the lyophilized extract presented a superior antioxidant capacity by the ABTS method 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolona-6-sulfónico) (60.31 μmol Trolox equivalents, TE). Antibacterial activity was dependent on the concentration of the hydromethanolic extract and the type of strain (*Gram-positive* were most sensitive than *Gram-negative*), with *Staphylococcus aureus* being the most sensitive bacteria (15.3 mm at 8 mg/mL of extract). *S. aureus* and *Escherichia coli* presented a high sensitivity concerning the MCI (3 mg/mL and 4mg/mL, respectively).

Keywords: ABTS, DPPH, nutraceutical foods, waste added-value, blackberry waste.

1. Introducción

A nivel global, se calcula que se pierden 1,3 billones de toneladas anuales de alimentos producidos (Vilariño; Franco; Quarrington, 2017; Xue; Liu, 2019; Abbade, 2020). Las pérdidas pueden ocurrir en cualquier etapa a lo largo de toda la cadena de producción, desde la etapa de producción agraria hasta el consumo por parte del cliente final. Se calcula que en la etapa de producción se pierde entre un 24 % y un 30 % de los alimentos producidos, mientras que en poscosecha se pierden alrededor de un 20 % y en la etapa de consumo un 30 % - 35 %, siendo las frutas y verduras (44 %) los alimentos que más se pierden (Vilariño *et al.*, 2017). Los productos vegetales, especialmente las frutas, poseen una variedad de compuestos químicos que actúan como agentes antioxidantes, sustancias que pueden neutralizar, prevenir o retrasar gran parte del proceso de oxidación (Cheok *et al.*, 2018; Ben-Othman; Jöudu; Bhat, 2020). La presencia de las vitaminas C, E y otros compuestos bioactivos son los principales antioxidantes presentes, siendo los fenoles el grupo más importante y prominente que actúan de forma directa e independiente del sistema enzimático (Coronado; Vega; Gutiérrez; Vázquez; Radilla, 2015). Los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos son los principales secuestradores de los radicales libres durante el proceso oxidativo (Mosquera; González; Cortés; Camargo, 2016; Zeb, 2020).

La prevención de enfermedades respiratorias, carcinogénicas, neurológicas, cardiovasculares y la disminución del envejecimiento son consecuencia del atrapamiento de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los compuestos fenólicos (Mosquera *et al.*, 2016; Samaniego *et al.*, 2020), atribuyéndoseles un efecto benéfico en la prevención de enfermedades (Kuskoski; Asuero; Troncoso; Mancini-Filho; Fett, 2005). Por otra parte, los antioxidantes de los alimentos aumentan su estabilidad de protección frente al deterioro por la acción de los ROS y aportan antioxidantes esenciales al organismo, complementando los niveles que el cuerpo humano produce y previniendo algunos de los procesos de oxidación celular (Vilaplana, 2007; Daza; Murillo; Pardo, 2015; Mahmoud; Abdelrazek, 2019; Xu; Hu; Wang; Cui, 2019).

Investigaciones científicas revelan la importancia del consumo de frutas, ya que constituyen la principal fuente de antioxidantes, además, una gran parte de estos frutos contienen compuestos capaces de inhibir o eliminar el desarrollo de microorganismos patógenos que pueden generar una alternativa para la conservación de alimentos de origen natural (Kizilkaya; Cevik; Turker, 2013; Laganà *et al.*, 2019; Villalobos-Delgado; Nevárez-Moorillon; Caro; Quinto; Mateo, 2019). Por tal motivo, hay un interés creciente en la industria alimentaria y en la investigación científica de fuentes de antioxidantes naturales, que protejan la salud de manera segura.

La mora (*Rubus glaucus benth*) es uno de los géneros más diversos de plantas y se distribuye en todo el mundo (Martínez-Cruz *et al.*, 2011). En Colombia se estima una producción de 94.151 toneladas anuales, lo que corresponde a la producción de unas 28.000 toneladas anuales de residuos de mora (López-Vásquez; Castaño-Zapata; Marulanda-Ángel; López-Gutiérrez, 2013; Rodríguez; Villegas, 2015). Su importancia nutricional radica en que los frutos de las especies del género *Rubus* contienen minerales, vitaminas y compuestos fenólicos a los cuales se les reconoce como agentes quimiopreventivos (Martínez-Cruz *et al.*, 2011).

La capacidad antioxidante se estudia por diversas metodologías ampliamente conocidas, como son la del ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS), la del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), la

de la N,N-dimetil-p-fenilenediamina (DMPD), la de la capacidad de absorber el radical oxígeno (ORAC) y el ensayo del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) (Kuskoski *et al.*, 2005). El método DPPH se considera como una metodología de determinación indirecta de la capacidad antioxidante, al estudiar la inhibición o disminución del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo al reaccionar con sustancias donadoras de H⁺ (Cerón; Higueta; Cardona, 2011). Por otra parte, la generación del radical DPPH es rápida y sin previas preparaciones, mientras que la generación del radical ABTS requiere el uso de agentes químicos (dióxido de manganeso, persulfato de potasio), enzimáticos (peroxidasa, mioglobulina) o vía electroquímica (Kuskoski *et al.*, 2005).

El método ABTS monitorea la desaparición del catión ABTS^{•+} cuando distintas moléculas lo atrapan al reaccionar (Cerón *et al.*, 2011). Además, distintas bandas de absorbancia hacen que sea más amplia la cantidad de compuestos que se pueden estudiar (414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico) gracias a una menor interferencia, a diferencia del DPPH que presenta su máximo de absorbancia únicamente a 515 nm (Kuskoski *et al.*, 2005).

El 70 % de las enfermedades gastrointestinales se les atribuye a alimentos contaminados con microorganismos tales como *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus*., debido, principalmente, a la contaminación cruzada o el deterioro de los alimentos (Venegas del Castillo; Vásquez-Valles, 2016; Gordillo, 2019; Maes *et al.*, 2019; Marin; Rodríguez; Minier; Zayas; Soler, 2020; Odeyemi; Alegbeleye; Strateva; Stratev, 2020).

La bacteria *E. coli* está asociada a enfermedades gastrointestinales producto del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene y prácticas inadecuadas de procesamiento y conservación (Argote *et al.*, 2017). *S. aureus* es una de las bacterias patógenas que más enfermedades causa a nivel circulatorio y gastrointestinal, generalmente, como una consecuencia de la mala manipulación de alimentos (Zendejas-Manzo; Avalos-Flores; Soto-Padilla, 2014). *B. cereus* por su parte, genera numerosas toxinas a partir de alimentos contaminados con cantidades de 10⁵ a 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de alimento (Sánchez; Correa; Castañeda-Sandoval, 2016).

Se debe tener en cuenta que la susceptibilidad bacteriana y los resultados del estudio de la capacidad antibacteriana, dependen en gran medida del método usado, de las cepas, el grado de solubilidad de los compuestos, entre otras, por lo cual deben ser tenidos en cuenta a la hora de ser seleccionados para el análisis de la actividad (Ramírez; Castaño, 2009). Los métodos utilizados se clasifican en métodos de dilución y método de difusión. Las técnicas que emplean la difusión de los compuestos son las más útiles para evitar que la solubilidad de los compuestos sea un factor limitante en el análisis (Ramírez; Castaño, 2009).

En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante del extracto etanólico, hidrometanólico y liofilizado por dos métodos (DPPH y ABTS) y la actividad antimicrobiana del extracto hidrometanólico, empleando el método de difusión en agar contra tres microorganismos patógenos.

2. Materiales y métodos

Los residuos de mora fueron obtenidos de una distribuidora y despulpadora de frutas y verduras ubicada en el barrio Santa Elena de la ciudad de Cali, situada en la región sur del Valle del Cauca, en las coordenadas 3°27'00"N, 76°32'00"O. Los residuos son una mezcla de semillas, cáscara, y pulpa de la fruta. Las muestras se conservaron en un congelador de -20 °C (*Barnstead/Lab-line, Waltham, Massachusetts, U.S.*) hasta su utilización. Todos los reactivos y solventes fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich (Palo Alto, California, U.S.)* y se usaron sin previa purificación.

2.1. Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de los residuos de mora se realizó con base en los métodos oficiales de análisis (AOAC). Los parámetros evaluados fueron: pH método 981,12; sólidos solubles método 932,12; humedad método 930,12; cenizas método 940,26 y acidez titulable método 942,15.

2.2. Preparación de los extractos etanólico, hidrometanólico y liofilizado

Los extractos se realizaron según la metodología propuesta por López *et al.* (2015). Se maceró los residuos de mora con un mortero. En un vaso de precipitados, se agregó 10 g de los residuos anteriormente macerados y se añadieron 30 mL de mezcla hidrometanólica (80:20 v/v) los cuales, se extrajeron durante 10 minutos. Luego se procedió a centrifugar a 4.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Seguidamente, el sobrenadante se filtró y se transfirió a un matraz de fondo redondo, y, finalmente, se evaporó a sequedad usando evaporación a presión reducida en un rotaevaporador (*Heidolph, Rotary Evaporators/Hei-VAP US*). En el segundo procedimiento se mezclaron 10 g de los residuos macerados con 30 mL de etanol. Se procedió a centrifugar a 4.000 rpm x 20 min a 4 °C, y, seguidamente, el sobrenadante se filtró y se transfirió a un matraz de fondo redondo. Se evaporó a sequedad usando un evaporador rotativo. El extracto liofilizado se preparó adicionando 10 g de los residuos de mora previamente macerados en tubos Falcon, los cuales fueron completados hasta un volumen de 30 mL con agua destilada, que después fueron congelados en un congelador de -20 °C (*Barnstead/Lab-line, Waltham, Massachusetts, U.S.*) por 24 horas. Posteriormente, los tubos se ubicaron en un liofilizador (*Labconco Freezone 4.5, Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA*) a una presión de 12 Pa y a -52 °C por 48 horas hasta sublimar completamente el agua de los residuos y dejarlos completamente secos para su posterior uso.

2.3. Caracterización de compuestos antioxidantes por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)

La preparación de la muestra consistió en secar a evaporación el extracto original de los residuos de mora (extractos obtenidos luego de macerar con mortero y evaporados a sequedad en rotaevaporador) y posterior redisolución en una mezcla hidrometanólica al 0,3 % en ácido acético (1:1 v/v). El extracto de residuos de mora fue analizado en un equipo cromatográfico líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC, *Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.*), equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC 3000) y acoplado a un analizador de masas (*Orbitrap*), usando una columna *Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 µm de tamaño de partícula)* a 30 °C. La fase móvil consistió en una solución acuosa de 0,2 % de formiato de amonio (A) y acetonitrilo con 0,2 % de formiato de amonio (B), con un gradiente que cambió linealmente en 8 minutos desde 100 % de A hasta 100 % de B. La identificación de los compuestos se realizó con el cromatograma de iones extraídos (EIC), medición de masas exactas ($\mu_{ppm} < 0,001$) y usando una solución estándar de antioxidantes y alcaloides de Sigma-Aldrich).

2.4. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH•

Se realizó usando el método desarrollado por Brand-Williams (Kuskoski *et al.*, 2005). El reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se preparó disolviendo $1,0 \pm 0,1$ mg en $100 \pm 0,02$ mL de metanol anhidro, en un frasco ámbar, para obtener una concentración de 10 mg/L. El reactivo se ajustó por dilución con metanol a una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ en una longitud de onda de 517 nm, dejándose en ausencia de luz hasta su utilización. Se tomaron 50 mg de la muestra en un tubo eppendorf y se llevó a 1 mL con metanol absoluto. Posteriormente, se centrifugó durante 1 minuto a 1800 rpm con el objetivo de tener una muestra homogénea.

Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizaron pasados los 30 minutos después de añadir la muestra. A partir de las absorbancias obtenidas se realizó una curva de calibración determinando el porcentaje de inhibición y la capacidad antioxidante de cada extracto expresando su resultado en Trolox (antioxidante de referencia, análogo de la vitamina E).

2.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS^{•+}

Inicialmente se disolvió $38,4 \pm 0,1$ mg de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), en 10 mL de agua desionizada para obtener una solución de concentración 7 mM. Posteriormente, se preparó una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2,45 mM disolviendo 66,2 mg de persulfato de potasio en 100 mL de agua desionizada. Seguidamente, se mezcló 10 mL de la solución ABTS y 10 mL persulfato de potasio en un frasco oscuro. La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 16 h; una vez formado el radical, fue diluido en etanol hasta alcanzar una absorbancia de $0,70 \pm 0,2$ a 754 nm. El radical ABTS^{•+} formado se mezcló con el extracto a diferentes concentraciones. El porcentaje de inhibición se obtuvo a través del uso de una curva de calibración basada en Trolox. Los resultados se expresaron en unidades de μmol Trolox equivalente/g de residuos de mora.

2.6. Determinación de la actividad antimicrobiana

2.6.1. Microorganismos y medios de crecimiento

La actividad antimicrobiana del extracto hidrometanólico de mora se evaluó contra dos bacterias *Gram positivas* (*Staphylococcus aureus* ATCC29213 y *Bacillus cereus* ATCC11788) y una bacteria *Gram negativa* (*Escherichia coli* ATCC25922) obtenidos del banco de cepas del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali y la cepa de *Bacillus cereus* ATCC 11788 donada por el Departamento de Biología de la Universidad del Valle.

2.6.2. Preparación del inóculo

Con un asa bacteriológica se tomó una colonia bien aislada del mismo tipo morfológico y se inoculó en 5 mL de caldo tripticasa de soya. Posteriormente, se incubó hasta visualizar una ligera turbidez. La concentración de bacterias se ajustó con caldo hasta obtener una turbidez visualmente comparable a un patrón de 0,5 en la escala de Mac Farland equivalente a 5×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL.

2.6.3. Preparación del medio

El medio Mueller-Hinton se preparó, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El medio preparado se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 min y, finalmente, se distribuyó en cajas de Petri estériles de manera equivalente. El medio preparado se conservó en refrigeración hasta su utilización teniendo en cuenta no exceder 7 días desde su preparación.

2.6.4. Ensayo de difusión en disco

Se realizó con base en la metodología del Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, (NCCLS) enunciado por Kirby-Bauer. Se sumergió un hisopo de algodón estéril dentro de la suspensión del microorganismo en estudio previamente estandarizado y se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio. Una vez la superficie del medio se encontraba seca, se procedió a colocar los discos con una pinza estéril. Cada caja de Petri contenía un disco según la dilución (2 mg/mL; 4 mg/mL; 6 mg/mL y 8 mg/mL) del extracto hidrometanólico. Como control positivo, se realizó una dilución para cada antibiótico, de acuerdo a la bacteria en estudio (*S. aureus*-cefalexina 3mg/mL; *E. coli*-ampicilina 1 mg/mL y *B. cereus*-vancomicina 3mg/mL), del cual se tomaron 10 μ L y se llevaron al sensidisco. Como control negativo, se usó agua destilada con la que se realizó las diluciones. Finalmente, se incubaron las cajas Petri a 35 °C. Los resultados se visualizaron 24 horas después de incubación.

2.6.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Este método se llevó a cabo por la técnica de dilución. Para cada bacteria se tomaron tubos de ensayo, los cuales contenían 4 mL de caldo tripticasa de soya y concentraciones crecientes de extracto. En cada tubo de ensayo se inoculó un número definido de células bacterianas ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL), a partir de una solución patrón de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 escala MacFarland), previamente estandarizada con caldo tripticasa de soya estéril e incubadas por 24 horas a temperatura óptima de crecimiento. Posteriormente, se verificó la absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro a 545 nm y, finalmente, todos los tubos de ensayo se incubaron durante 9 horas para la bacteria. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de cada tubo para determinar en cuáles de ellos se inhibió el crecimiento del microorganismo. La presencia de turbidez o sedimentación indica el crecimiento, es decir, generaría un aumento en el valor de la absorbancia de la solución contenida en el tubo y un valor menor o igual indica la inhibición por parte del antimicrobiano. El valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinado por el tubo de ensayo de menor concentración de extracto que inhibió el desarrollo *in vitro* del microorganismo.

2.6.6. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y sus resultados fueron expresados como valores promedio \pm desviación estándar. Con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en los resultados obtenidos para la susceptibilidad bacteriana, se presentan las pruebas de significancia estadística (contrastes para evaluar diferencias entre grupos) según cumplimiento de supuestos para su aplicación. Las pruebas se desarrollaron haciendo uso del software estadístico R-3.2.5, herramienta de análisis estadístico de libre distribución.

Prueba de Hipótesis:

H_0 : No existen diferencias en **variable** por nivel de concentración ($\mu_2 = \mu_4 = \mu_6 = \mu_8$)

H_1 : Si existen diferencias en **variable** en al menos un nivel de concentración.

*Prueba de Hipótesis solo para susceptibilidad antimicrobiana.

El valor obtenido en la significación permite decidir si se rechaza o no la hipótesis.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización fisicoquímica

Los resultados obtenidos en las variables del análisis proximal de los residuos correspondientes a una mezcla de semillas, cáscara y pulpa de *Rubus glaucus* Benth, se encuentran dentro del rango para frutos maduros Tabla 1.

Tabla 1.

Caracterización fisicoquímica de los residuos de mora *Rubus glaucus* benth con base en los métodos oficiales de análisis (AOAC)

Variables	Promedio	Desviación estándar	CV
Acidez titulable (%)	1,28	0,04	3 %
Cenizas (%)	0,45	0,0004	9 %
Humedad (%)	86,0	0,005	1 %
pH	3,23	0,03	1 %
Sólidos Solubles	1,34	0,001	0 %

CV: coeficiente de variación de Pearson

Fuente: elaboración propia.

Generalmente, la acidez en la mayoría de las frutas disminuye durante y después del proceso de maduración. Barreto *et al.* (2016), Nair, Saxena y Kaur (2018) y Wu, Lu y Wang (2016) afirman que los ácidos contenidos en las frutas se consumen en la respiración a lo largo del tiempo, dando ascenso a nuevos compuestos, lo que explica el 1,28 % de acidez obtenido. El porcentaje de humedad alcanzado fue superior al 85 %, valor que coincide con los publicados por Ayala, Valenzuela y Bohórquez (2013). Este comportamiento es regular en la fruta fresca, ya que el agua es el componente mayoritario en su periodo de poscosecha, por tal motivo, presentan un periodo de vida corto (Ríos; Giraldo; Duque, 2007).

El porcentaje de cenizas obtenido fue de 0,45 %, valor que representa el contenido de material inorgánico, como minerales y sales inorgánicas en el fruto (Velciov *et al.*, 2019). El pH es uno de los parámetros con mayor variabilidad, debido a que los ácidos orgánicos contenidos en el fruto verde se van transformando o degradando a medida que el fruto respira, lo cual genera un incremento paulatino con los días de maduración del fruto, con un valor de 3,23 %, muy cercano al obtenido en otras investigaciones para el extracto del fruto (Ramos; Delgado; Bautista; Morales; Duque, 2005; Rodríguez; López; García, 2010). El valor obtenido indica el grado de acidez del residuo de mora que correlaciona muy bien con el valor del porcentaje de acidez obtenido (con un valor de 1,28 %), que refleja el contenido de ácidos orgánicos y de alta capacidad antioxidante presentes en la mora, tales como el ácido ascórbico, el ácido gálico, el ácido *p*-hidroxibenzoico, el ácido caféico, el ácido rosmarínico, entre otros (Ramos *et al.*, 2005). El contenido de sólidos solubles fue de 1,34 % (4,7 °Brix), lecturas que concuerdan con los publicados por Grijalba, Calderón y Pérez (2016). Este valor indica la cantidad de azúcar (sacarosa) presente en el fruto. Frecuentemente, se consideran los °Brix como equivalentes de los sólidos solubles, porque el mayor contenido de estos en el jugo de las frutas son azúcares (Rodríguez *et al.*, 2010). Estos valores obedecen a los cambios bioquímicos naturales en el fruto durante el proceso de maduración, lo cual, de acuerdo con los resultados obtenidos está en concordancia con otros estudios reportados para el análisis de extractos de mora (Rodríguez *et al.*, 2010; Ochoa; Pérez; Ávila; Gómez; García, 2019; Salcedo, 2019).

a. Caracterización de compuestos antioxidantes por UHPLC

La caracterización del extracto de residuos de mora obtenido por UHPLC, determinó la presencia de cianidina-3-rutinosido (Figura 1) en una concentración de 2520 mg/kg de muestra (t_r , 3,56 min, Figura 2). Este compuesto es un colorante natural muy común en frutas con bayas negras o moradas, como el agraz (*Vaccinium meridionale*) y la mora (*R. glaucus*), que normalmente muestra altos contenidos de antocianinas y fenoles (Garzón; Riedl; Schwartz, 2009; Osorio *et al.*, 2012). Es una antocianina altamente soluble en agua, bastante inestable en temperaturas superiores a 40 °C.

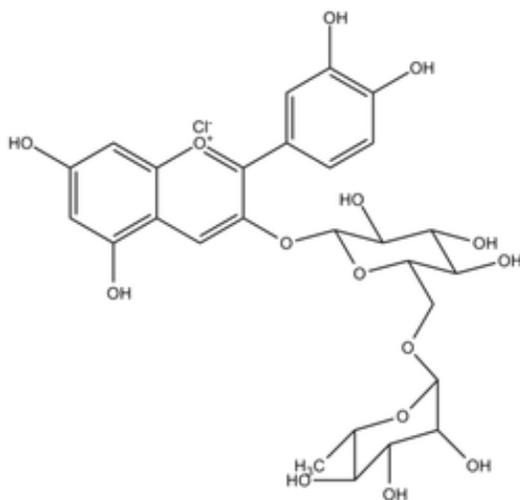


Figura 1. Estructura química de la antocianina cianidina-3-rutinosido
Fuente: elaboración propia.

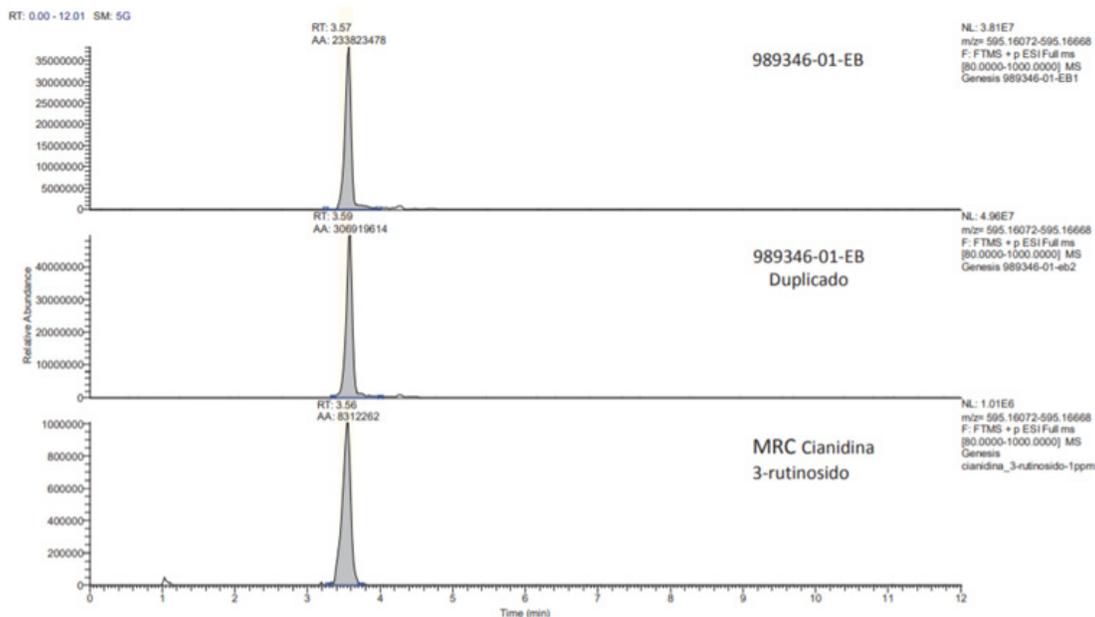


Figura 2. Cromatograma UHPLC de la antocianina cianidina-3-rutinosido
Fuente: elaboración propia.

b. Actividad antioxidante

Los extractos de mora evaluados demostraron actividad antioxidante por los métodos *in vitro* ABTS y DPPH (Tabla 2).

Tabla 2.

Resultados obtenidos capacidad antioxidante para los extractos alcohólicos y liofilizado de residuos de mora (*R. glaucus* Benth) por los métodos *in vitro* ABTS y DPPH

Extracto	Método ABTS ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalente/g mora)	Método DPPH ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalente/g mora)
Extracto etanólico (100 %)	49,28	9,21
Extracto hidrometanólico (80:20 % v/v)	37,27	40,53
Extracto liofilizado	60,31	9,03

Fuente: elaboración propia.

La acción antioxidante de un alimento está profundamente influenciada por la reacción de diferentes grupos presentes en sus metabolitos con los radicales libres y las especies ROS, tales como grupos hidroxilo, enlaces conjugados, entre otros contenidos en fenoles, flavonoides, antocianinas, terpenos, etc. (Zapata; Cortes; Rojano, 2013; Durazzo; Lucarini; Novellino; Daliu; Santini, 2019; Gündeşli; Korkmaz; Okatan, 2019; Ismawanti; Suparyatmo; Wiboworini, 2019). Un gran número de frutas contienen niveles importantes de fenoles, como la mora, fruta perteneciente al grupo de las bayas. Huang, Zhang, Liu y Li (2012) afirman que las bayas (arándano, mora y fresa) exhiben buena capacidad antioxidante, principalmente, porque poseen compuestos fenólicos con grupos hidroxilo en la posición orto del anillo B.

Investigaciones realizadas afirman la importancia de la mora como fuente rica en polifenoles, especialmente flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles y proantocianinas) y elagitaninos (Quirós, 2016; Salcedo, 2019). En el presente estudio, el componente mayoritario encontrado en el extracto de los residuos de mora correspondió a la antocianina cianidina-3-rutinosido (Figura 1) en una concentración de 2.520 mg/kg de muestra.

La extracción con solventes es el método más común para aislar compuestos fenólicos de diferentes matrices, por lo cual se utilizaron disolventes polares, como metanol y etanol (Lima *et al.*, 2019; Rocchetti *et al.*, 2019; Dzah *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante fueron expresados en μmol equivalente de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), el cual es un análogo soluble en agua de la vitamina E, utilizado como compuesto de referencia, principalmente, para los métodos anteriormente mencionados (Tovar del Rio, 2013).

Los resultados (Tabla 2) muestran que para todos los extractos incluida la mora liofilizada, los valores de ABTS son mayores que en la técnica con DPPH, debido a una alta reactividad del ABTS^{•+} (con poca selectividad), reaccionando con cualquier grupo hidroxilo sin que ello realmente indique un alto potencial antioxidante. Según Palomino, García, Gil, Rojano y Durango (2009) el radical DPPH no reacciona con flavonoides sin hidroxilar en el anillo B, ni con ácidos aromáticos monohidroxílicos, por lo cual es más selectivo que el ABTS^{•+}.

En el método ABTS se evidenció que el extracto con menor actividad antioxidante fue el obtenido mediante el uso de la mezcla hidrometanólica (80:20) con un valor de 37,27 μmol equivalente Trolox/g mora, mientras que el extracto obtenido con etanol puro presentó mayor capacidad antioxidante (49,28 μmol equivalente Trolox/g mora). Por otra parte, la liofilización de los residuos de mora permitió obtener un valor más alto de actividad antioxidante por el método ABTS (60,31 μmol equivalente Trolox/g mora). Tarín (2015) afirma que en el proceso de liofilización se produce un aumento del contenido de fenoles totales gracias a la

congelación previa formando cristales de hielo que destruyen la estructura celular, facilitan el acceso de las moléculas del solvente y mejoran la extracción.

Por medio del ensayo DPPH se obtuvieron valores para la actividad antioxidante de 9,03 μmol equivalente Trolox/g mora para los residuos liofilizados, 9,21 μmol equivalente Trolox/g mora para el extracto etanólico y 40,53 μmol equivalente Trolox/g mora para el extracto metanólico. La actividad captadora del radical encontrada en el extracto metanólico es considerablemente superior al extracto etanólico y mora liofilizada. Lo anterior puede estar asociado a que durante el tratamiento con metanol se extrajeron algunos compuestos fenólicos de alta polaridad, además de ser previamente preparado con este solvente. En el ensayo del DPPH, los radicales se eliminan gracias a la donación de hidrógenos, mientras que la reducción del radical de ABTS se debe a la eliminación de radicales protónicos inducida a través de la donación de electrones (García, 2017).

Los datos arrojados por los métodos ABTS y DPPH en residuos de mora se encuentran cercanos a los publicados por Zapata *et al.* (2013), quienes investigaron la capacidad antioxidante total de la guayaba agria (*Psidium araca*), fruto con mayor poder antioxidante, con valores de 66,80 μmol Trolox equivalente/g de fruta fresca para el ensayo ABTS y 11,79 μmol Trolox equivalente/g de fruta para el ensayo DPPH.

c. Actividad antimicrobiana

Los efectos antimicrobianos de fuentes naturales son uno de los motivos por los cuales en forma permanente se realizan investigaciones de compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos y aumentar la vida útil de los alimentos. La actividad antimicrobiana de los residuos de *R. glaucus benth* se evaluó con halos de inhibición, con el promedio del diámetro para los dos grupos de bacterias (*Gram positivas* y *Gram negativas*, Figura 3).

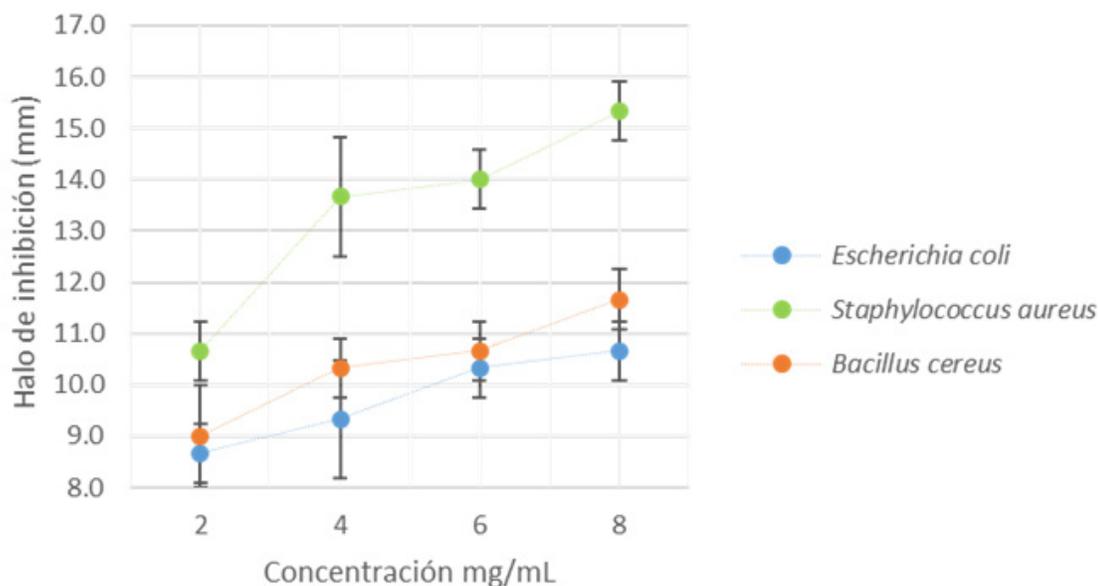


Figura 3. Distribución del halo de inhibición promedio a concentraciones de 2, 4, 6 y 8 mg/mL del extracto metanólico para las bacterias *E.coli*, *S.aureus* y *B.cereus*

Fuente: elaboración propia.

Los valores de inhibición promedio mostraron mayor sensibilidad para bacterias *Gram positivas* *S. aureus* y *B. cereus* que para la bacteria *Gram negativa* *E. coli*. Esto podría deberse a las diferencias estructurales

de las superficies celulares, en particular, de las bacterias *Gram negativas* con una pared celular que posee una membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicano muy delgada, una capa adicional compuesta por lipopolisacáridos y lipoproteínas (Nieto; González, 2010), la cual puede impedir el ingreso de compuestos hidrofílicos, en comparación a los microorganismos *Gram positivos*, pues está compuesta por una capa externa de peptidoglicano y una membrana citoplasmática.

A bajas concentraciones (Figura 3) hay menor efecto inhibitorio respecto al control. *E. coli* presentó menor inhibición con la formación de un halo de 10,7 mm para la concentración más alta, en comparación al halo de inhibición del crecimiento formado por el antibiótico ampicilina de 29,0 mm. Teniendo en cuenta los patrones estándar del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC25922 elaborado por la NCCLS, 2000 (*Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests*) se encuentra dentro la categoría resistente (Resistente ≤ 13 , Intermedia 14-16, sensible ≥ 17). Los microorganismos resistentes son aquellos que no se inhiben por las concentraciones empleadas, probablemente porque existen mecanismos de resistencia específicos (Picazo, 2000; Founou; Founou; Essack, 2017; Zaman *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).

B. cereus por su parte, presentó una inhibición media de crecimiento, con la formación de un halo de 11,7 mm para la concentración de 8 mg/mL del extracto metanólico y para el control positivo (vancomicina) se obtuvo un valor de 35,0 mm. Sin embargo, la bacteria *B. cereus* se encuentra dentro de la categoría resistente (Resistente ≤ 13 , Intermedia 14-17, sensible ≥ 18).

Por último, *S. aureus* presentó mayor grado de sensibilidad frente al extracto metanólico con un halo de inhibición para la concentración de 8 mg/mL de 15,3 mm, frente al antibiótico cefalexina 38,0 mm. De acuerdo con las tablas publicadas por la NCCLS para el antibiótico cefalexina, los datos obtenidos se encuentran en la categoría intermedia (Resistente ≤ 14 , Intermedia 15-16, sensible ≥ 17). Esta categoría representa cuando un aislamiento bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un tratamiento terapéutico incierto (Cantón, 2010). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sotelo, Casas y Camelo (2010) que también observaron mayor sensibilidad en *Gram positivas* por parte de extractos naturales más ricos en compuestos fenólicos.

El mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos no es del todo conocido. Sin embargo, se conoce que los agentes antimicrobianos de origen natural pueden afectar la síntesis de ergosterol, afectando la membrana citoplasmática, crean canales o pequeños orificios en la membrana por los cuales otros compuestos pueden atravesar y afectar las mitocondrias, el núcleo (los ácidos nucleicos), enzimas, las proteínas transmembranales, estrés oxidativo, la permeabilidad y, en última instancia, destruyendo la integridad celular (Mercado; Llenque; Trujillo, 2014; Castro-Montoya; Rangel-Peraza; Piña-Hernández; Mora-Rochín; Rochín-Medina, 2015; Grande-Tovar; Chaves-López; Serio; Rossi; Paparella, 2018).

La resistencia de *E. coli* frente a las sustancias antibacterianas se debe a una capa gruesa de lipopolisacáridos que actúa como barrera hidrofóbica, impidiendo la penetración y, además, también se debe a la presencia de enzimas en el espacio periplasmático que destruyen sustancias introducidas desde el exterior (Sotelo *et al.*, 2010). Por el contrario, para *S. aureus* la estructura de la membrana citoplasmática, permite a las sustancias antibacterianas destruir fácilmente la membrana de la célula ocasionando una salida del citoplasma.

De acuerdo con Sulca (2010), la mayoría de los extractos naturales que presentan actividad antimicrobiana contienen fenoles, terpenos, terpenos oxigenados, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos y flavonoides (antocianinas), conocidos como metabolitos secundarios.

Uno de los posibles mecanismos propuestos para el efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos está relacionado con la inactivación de enzimas celulares, la cual depende de la relación de la penetración de estos compuestos a la célula del microorganismo o por cambios en la permeabilidad de la membrana, en donde

los compuestos fenólicos pueden romper la integridad de dicha membrana y causar la pérdida de la integridad celular y una eventual muerte celular (Bouarab; Degraeve; Ferhout; Bouajila; Oulahal, 2019; Lima *et al.*, 2019; Dzah *et al.*, 2020).

Otra investigación indica que el mecanismo de la inhibición microbiana por los compuestos de bayas donde se incluyen las moras, se considera una acumulación de acciones directas e indirectas. Lacombe y Wu (2017) afirmaron que las acciones directas se consideran, principalmente, como las reacciones fitoquímicas con la membrana celular que causan la inactivación de enzimas celulares esenciales. Se considera que las acciones indirectas son efectos fitoquímicos sobre la disponibilidad de nutrientes o la expresión genómica que dan como resultado un deterioro del metabolismo y la función del microorganismo objetivo.

Luego de observar la inhibición del extracto metanólico por el método de difusión en disco, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MCI) por la técnica de dilución para las bacterias *S. aureus* y *E. coli* que fueron las más sensibles. Este método se realizó con el objetivo de determinar la mínima concentración del extracto que inhibe el crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, las cuales han sido asociadas en su gran mayoría al manejo deficiente de los alimentos (Castro del Campo; Chaidez; Rubio; Valdez, 2004). En la Figura 4 se observa un porcentaje de inhibición del 99 % para *S. aureus* a una concentración de 3,0 mg/mL mientras para *E. coli* se obtuvo un porcentaje de inhibición del 76 %, por lo cual fue necesario realizar dos concentraciones superiores, alcanzando un porcentaje de inhibición del 100 % a una concentración de 4,0 mg/mL.

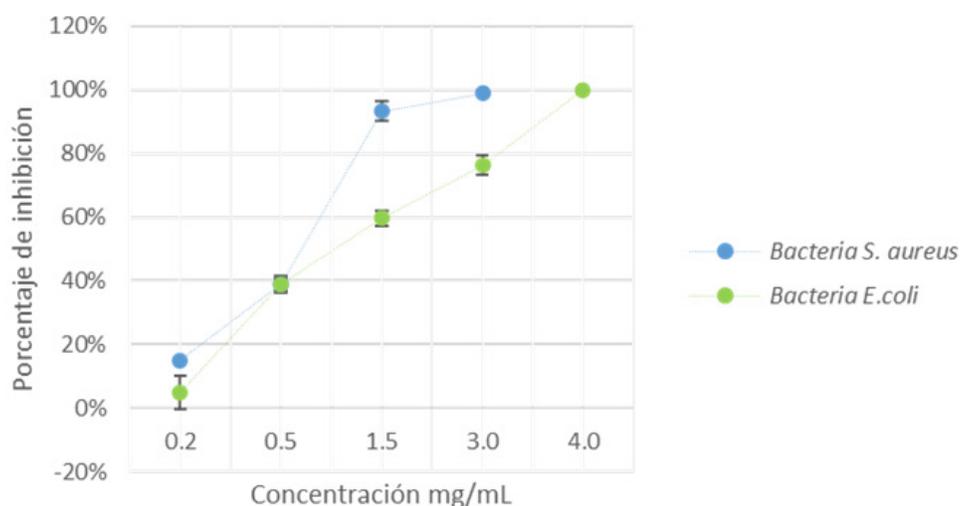


Figura 4. Distribución del porcentaje de inhibición promedio vs la concentración del extracto metanólico para la bacteria *E. coli* y *S. aureus*
Fuente: elaboración propia.

De acuerdo con lo descrito por Cruz-Carrillo, Rodríguez y Rodríguez (2010), una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una MCI inferior a 12,5 mg/mL, una media sensibilidad entre 12,5 y 50,0 mg/mL, y de baja sensibilidad cuando la MCI está entre 50 y 100 mg/mL. El análisis estadístico de los resultados obtenidos mostró diferencias significativas (ANOVA $p < 0,05$) en el método de difusión en disco para las concentraciones de 2 mg/mL y 8 mg/mL para todas las bacterias en estudio y diferencias significativas para todas las concentraciones utilizadas en el método de dilución. Estas diferencias se deben al grupo perteneciente de cada bacteria y la concentración. Como se puede observar en los dos métodos existe una diferencia entre *S. aureus* y *E. coli*, es decir, para la bacteria *S. aureus* se necesita menos cantidad de extracto para inhibir el crecimiento bacteriano que para *E. coli*. Lo anterior, permite concluir que para las cepas evaluadas de *S. aureus* y *E. coli* se presentó una sensibilidad alta, lo cual concuerda con su actividad antioxidante moderada

presentada gracias al contenido de ácidos orgánicos y de la antocianina cianidina-3-rutinosido (Figura 1), en una concentración de 2.520 mg/kg de muestra.

4. Conclusiones

Los residuos de mora obtenidos en el presente estudio presentaron una alta cantidad de la antocianina cianidina-3-rutinosido (2.520 mg/kg de muestra) mediante el análisis de UHPLC, una acidez titulable de 1,28 %, un pH ácido (3,23) y un contenido de cenizas de 0,45 %. El extracto hidrometanólico 80:20 % (v/v) presentó la mayor capacidad antioxidante por el método DPPH (40,53 μ mol TEAC), mientras que el extracto liofilizado presentó el valor más alto de actividad antioxidante por el método ABTS (60,31 μ mol TEAC). La susceptibilidad bacteriana a los residuos de mora se evidenció por el método de difusión en disco, observando un incremento dependiente de la concentración de extracto y de la cepa de cada bacteria. En relación con la concentración, la mayor inhibición se dio a concentraciones superiores, afectando la viabilidad de las cepas bacterianas. Las cepas evaluadas de *S. aureus* y *E. coli* presentaron una sensibilidad alta respecto a la MCI (3 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente), lo cual concuerda con su contenido de ácidos orgánicos (índice de acidez de 1,28 %) y el contenido de la antocianina cianidina-3-rutinosido (2.520 mg/kg de muestra).

5. Agradecimientos

Los autores agradecen profundamente el apoyo de la profesora Elena Stashenko para la caracterización por UHPLC de los extractos de residuos mora en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

Referencias

- Abbade, Eduardo (2020). Estimating the nutritional loss and the feeding potential derived from food losses worldwide. *World Development*, 134, 105038.
<https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.105038>
- Argote, Francisco; Suarez, Zully; Tobar, Magaly; Pérez, José; Hurtado, Andrés; Delgado, Johannes (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 52-60.
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)EdiciónEspecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)EdiciónEspecialn2.578)
- Ayala, Leidy; Valenzuela, Claudia; Bohórquez, Yanneth (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis estados de madurez. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 10-18.
- Barreto, Tainá; Andrade, Sonalle; Maciel, Janeeyre; Arcanjo, Narciza; Madruga, Marta; Meireles, Bruno; Cordeiro, Ângela; Souza, Evandro; Magnani, Marciane (2016). A Chitosan Coating Containing Essential Oil from *Origanum vulgare* L. to Control Postharvest Mold Infections and Keep the Quality of Cherry Tomato Fruit. *Frontiers in Microbiology*.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01724>
- Ben-Othman, Sana; Jõudu, Ivi; Bhat, Rajeev (2020). Bioactives from Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules*, 25(3), 510.
<https://doi.org/10.3390/molecules25030510>

- Bouarab, Lynda; Degraeve, Pascal; Ferhout, Hicham; Bouajila, Jalloul; Oulahal, Nadia (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457-1474.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Cantón, Rafael (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(6), 375-385.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.001>
- Castro del Campo, Nohelia; Chaidez, Cristóbal; Rubio, Werner; Valdez, José (2004). Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(1), 83-86.
- Castro-Montoya, Jesús; Rangel-Peraza, Jesús; Piña-Hernández, Claribel; Mora-Rochín, Saraïd; Rochín-Medina, Jesús (2015). Actividad antioxidante de compuestos fenólicos en semillas de ajonjolí y su efecto sobre el crecimiento bacteriano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2, 63-70.
- Cerón, Ivonne; Higueta, Juan; Cardona, Carlos (2011). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5, 17-26.
- Cheok, Choon; Adzahan, Noranizan; Rahman, Russly; Abedin, Nur; Hussain, Norhayati; Sulaiman, Rabiha; Chong, Gun (2018). Current trends of tropical fruit waste utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(3), 335-361.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1176009>
- Coronado, Marta; Vega, Salvador; Gutiérrez, León; Vázquez, Marcela; Radilla, Claudia (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212.
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Cruz-Carrillo, Anastasia; Rodríguez, Natalia; Rodríguez, Carlos (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 117-124.
- Daza, Luis; Murillo, Elizabeth; Pardo, Daniel (2015). Evaluación de la capacidad antioxidante de frutas cultivadas en el departamento del Tolima y sus residuos agroindustriales. *Revista Tumbaga*, 2(10), 3-14.
<http://orcid.org/0000-0002-9932-7163>
- Durazzo, Alessandra; Lucarini, Massimo; Novellino, Ettore; Daliu, Patricia; Santini, Antonello (2019). Fruit-based juices: Focus on antioxidant properties—Study approach and update. *Phytotherapy Research*, 33(7), 1754-1769.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6380>
- Dzah, Courage; Duan, Yuqing; Zhang, Haihui; Wen, Chaoting; Zhang, Jixian; Chen, Guangying; Ma, Haile (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Founou, Raspail; Founou, Luria; Essack, Sabiha (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 12(12), e0189621.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
- García, Rafael (2017). *Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de Moringa oleifera de diferente origen geográfico* (trabajo de grado). Universidade da Coruña, España.

- Garzón, G.; Riedl, K.; Schwartz, S. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science*, 74(3), C227–C232.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01092.x>
- Gordillo, Marco (2019). *Prevalencia de Salmonella spp. en alimentos contaminados y descripción según serotipos; tipos de alimentos y jurisdicciones sanitarias afectadas en Chiapas, durante el periodo 2016-2018* (tesis de maestría). Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, México.
- Grande-Tovar, Carlos; Chaves-López, Clemencia; Serio, Annalisa; Rossi, Chiara; Paparella, Antonello (2018). Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 61-71.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.019>
- Grijalba, Carlos; Calderón, Luz; Pérez, María (2010). Rendimiento y calidad de la fruta en mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con y sin espinas, cultivada en campo abierto en Cajicá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 6(1), 24-41.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.2079>
- Gündeşli, Muhammet; Korkmaz, Nazan; Okatan, Volkan (2019). Polyphenol content and antioxidant capacity of berries: A review. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3(2), 350-361.
- Huang, Wu-yang; Zhang, Hong-cheng; Liu, Wen-xu; Li, Chun-yang (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 13(2), 94-102.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1100137>
- Ismawanti, Zuhria; Suparyatmo, Joseph; Wiboworini, Budiyaniti (2019). The Effects of Papaya Fruit as Anti Diabetes: A Review. *International Journal of Nutrition Sciences*, 4(2), 65-70.
<https://doi.org/10.30476/IJNS.2019.81751.1013>
- Kizilkaya, Bayram; Cevik; Nazan; Turker, Gulen (2013). The phenolic compounds in berries: beneficial effects on human health. *New Knowledge Journal of Science*, 52-55.
- Kuskoski, E.; Asuero, Agustín; Troncoso, Ana; Mancini-Filho, Jorge; Fett, Roseane (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 25(4), 726-732.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lacombe, Alison; Wu, Vivian (2017). The potential of berries to serve as selective inhibitors of pathogens and promoters of beneficial microorganisms. *Food Quality and Safety*, 1(1), 3-12.
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx001>
- Laganà, Pasqualina; Anastasi, Giuliano; Marano, Fiorella; Piccione, Serena; Singla, Rajeev; Dubey, Ashok; Delia, Santi; Coniglio, Maria; Facciola, Alessio; Di Pietro, Angela; Haddad, Moawiya; Al-Hiary, Masnat; Caruso, Gabriella (2019). Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 102(5), 1378-1387.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1378>
- Lima, M.; Paiva, C.; Fernandez-Prada, C.; Harel, J.; Dubreuil, J.; de Souza, E. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130, 259-270.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>

- López-Vásquez, Juan; Castaño-Zapata, Jairo; Marulanda-Ángel, Marta; López-Gutiérrez, Ana (2013). Caracterización de la resistencia a la antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y productividad de cinco genotipos de mora (*Rubus glaucus Benth.*). *Acta Agronómica*, 62(2), 174-185.
- López, Clemencia; Mazzarrino, Giovanni; Rodríguez, Aida; Fernández-López, Juana; Pérez-Álvarez, José; Viuda-Martos, Manuel (2015). Assessment of antioxidant and antibacterial potential of borojo fruit (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas) from the rainforests of South America. *Industrial Crops and Products*, 63, 79-86.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.047>
- Maes, Sharon; Heyndrickx, Marc; Vackier, Thijs; Steenackers, Hans; Verplaetse, Alex; de Reu, Koen (2019). Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *Journal of Food Protection*, 82(2), 262-275.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-226>
- Mahmoud, Yasmina; Abdelrazek, Heba (2019). Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108783.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108783>
- Marin, Mayelin; Rodríguez, Arístides; Minier, Laidelbis; Zayas, Ekaterine; Soler, Raxsy (2020). Caracterización de agentes bacterianos aislados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *MEDISAN*, 24(2), 235-251.
- Martínez-Cruz, Nieves; Arévalo-Niño, Katiushka; Verde-Star, María; Rivas-Morales, Catalina; Oranday-Cárdenas, Azucena; Núñez-González, Adriana; Morales-Rubio, Eufemia (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus Schltldl* (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42, 66-71.
- Mercado, Pedro; Llenque, Luis; Trujillo, María (2014). Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentración de aceite de *Citrus reticulata* variedad Satsuma "mandarina". *Revista ciencia y tecnología*, 10(2), 61-71.
- Mosquera, Oscar; González, Lina; Cortés, Yeny; Camargo, Juan (2016). Caracterización fitoquímica, determinación del contenido de lignina y la actividad antioxidante de los culmos de *Guadua angustifolia Kunth*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 11(2), 124.135.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.1301>
- Nair, Sneha; Saxena, Alok; Kaur, Charanjit (2018). Effect of chitosan and alginate-based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava L.*). *Food Chemistry*, 240, 245-252.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.122>
- Nieto, Leonardo; González, Wilmer (2010). *Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y letal de los extractos de cebolla roja (Allium cepa L.) para Escherichia coli y Staphylococcus aureus* (tesis de pregrado). Universidad de Cartagena, Colombia.
- Ochoa, Eréndira; Pérez, Rosa; Ávila, Teresa; Gómez, Juan; García, Pedro (2019). Propiedades fisicoquímicas de frutos silvestres de *Rubus* con potencial nutracéutico y alimenticio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (23), 291-301.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2028>
- Odeyemi, Olumide; Alegbeleye, Oluwadara; Strateva, Mariyana; Stratev, Deyan (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311-331.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>

- Osorio, Coralia; Hurtado, Nelson; Corinna, Dawid; Hofmann, Thomas; Heredia-Mira, Francisco; Morales, Alicia (2012). Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chemistry*, 132(4), 1915-1921.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.026>
- Palomino, Lady; García, Carlos; Gil, Jesús; Rojano, Benjamín; Durango, Diego (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.
- Picazo, Juan (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia10.pdf>
- Quirós, Ana (2016). *Obtención de un extracto etanólico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora* (tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Ramírez, Luz; Castaño, Darwin (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, 15(42), 263-268.
<https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Ramos, F.; Delgado, J.; Bautista, E.; Morales, A.; Duque, C. (2005). Changes in volatiles with the application of progressive freeze-concentration to Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Engineering*, 69(3), 291-297.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.07.022>
- Ríos, Eunice; Giraldo, Germán; Duque, Alba (2007). Predicción de la actividad de agua en frutas tropicales. *Revista de Investigaciones*, 17, 27-32.
- Rocchetti, Gabriele; Blasi, Francesca; Montesano, Domenico; Ghisoni, Silvia; Marcotullio, María; Sabatini, Stefano; Cossignani, Lina; Lucini, Luigi (2019). Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. *Food Research International*, 115, 319-327.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.046>
- Rodríguez, Cristian; Villegas, Brenda (2015). *Caracterización de los cultivos de mora de castilla (Rubus Glaucus Benth) con espinas, en dos fincas del municipio de Guática, Risaralda* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
<http://hdl.handle.net/11059/6118>
- Rodríguez, Ligia; López, Leslie; García, Maribel (2010). Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus glaucus* B.), maracuyá (*Passiflora edulis* S.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y papayuela (*Carica cundinam*). *Alimentos Hoy*, 19(21), 35-42.
- Salcedo, Dayanna (2019). *Evaluación de características botánicas morfológicas y fisicoquímicas, y el contenido de polifenoles y vitamina C de cuatro cultivares de mora (Rubus glaucus) para determinar su estabilidad durante el periodo de cosecha* (tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Samaniego, Iván; Brito, Beatriz; Viera, William; Cabrera, Ana; Llerena, Wilma; Kannangara, Tissa; Vilcundo, Rubén; Angós, Ignacio; Carrillo, Wilman (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), 1027.
<https://doi.org/10.3390/plants9081027>
- Sánchez, Jennifer; Correa, Margarita; Castañeda-Sandoval, Laura (2016). *Bacillus cereus* an important pathogen the microbiological control of food. *Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2). 230-242.
<https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12>

- Sotelo, Indira; Casas, Nidia; Camelo, Gustavo (2010). Borojó (*Borojoa patinoi*): fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae*, 17(3), 329-336.
- Sulca, Tania (2010). *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de Acmella repens (Botoncillo), Urtica dioica (Ortiga negra) y Sonchus oleraceus (Kana yuyo), plantas registradas en la parroquia La Esperanza – Imbabura, sobre Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans, causantes de enfermedades bucofaríngeas.* (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Tarín, Miriam (2015). *Evaluación de la calidad funcional de extractos de mora y fresa liofilizada.* (tesis de pregrado). Universitat Politècnica de València, España.
<http://hdl.handle.net/10251/55561>
- Tovar del Río, Jennifer (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera* (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Velcirov, Ariana; Birtea, A.I.; Popescu, Sofia; Nicolae, A.; Zippenfening, Simelda; Dinu, Monica; Hădărugă, Nicoleta (2019). Preliminary research on the proximate composition of blackberry fruits (*Rubus fruticosus*). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 25(4), 248–251.
- Venegas del Castillo, Alan; Vásquez-Valles, María (2016). Efecto del aceite esencial de Lantana cámara sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Revista Rebiol*, 36(1), 29-37.
- Vilaplana, Montse (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos. Vitaminas, minerales y suplementos. *Elsevier*, 26(10), 11-41.
- Vilariño, María; Franco, Carol; Quarrington, Caitlin (2017). Food loss and Waste Reduction as an Integral Part of a Circular Economy. *Frontiers in Environmental Science*, 5, Art.21.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00021>
- Villalobos-Delgado, Luz; Nevárez-Moorillon, G.; Caro, Irma; Quinto, Emiliano; Mateo, Javier (2019). Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life. In: Charis, Galanakis (Ed.), *Food Quality and Shelf Life* (pp. 125-157). Vienna, Austria: Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00004-5>
- Wu, Shengjun; Lu, Mingsheng; Wang, Shujun (2016). Effect of oligosaccharides derived from *Laminaria japonica*-incorporated pullulan coatings on preservation of cherry tomatoes. *Food Chemistry*, 199, 296-300.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.029>
- Xu, Dong; Hu, Meng-Jiao; Wang, Yan-Qiu; Cui, Yuan-Lu (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6), 1123.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
- Xue, Li; Gang, Liu (2019). Introduction to global food losses and food waste. In: Charis, Galanakis (Ed.), *Saving Food* (pp. 1-31). Chania, Greece: Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815357-4.00001-8>
- Yang, Yuyi; Song, Wenjuan; Lin, Hui; Wang, Weibo; Du, Linna; Xing, Wei (2018). Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environment International*, 116, 60-73.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.011>
- Zaman, Sojib; Hussain, Muhammed; Nye, Rachel; Mehta, Varshil; Mamun, Kazi; Hossain, Naznin (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6), e1403.
<https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
- Zapata, Karol; Cortes, Farid; Rojano, Benjamín (2013). Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de Guayaba Agría (*Psidium araca*). *Información Tecnológica*, 24(5), 103-112.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500012>

Zeb, Alam (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394.

<https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>

Zendejas-Manzo, Guadalupe; Avalos-Flores, Héctor; Soto-Padilla, Marisela (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, 25, 129-143.