

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



**EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES PRESENTES EN LAS
HOJAS DE *Moringa oleífera* (Lam) Y EVALUACIÓN DE
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Proyecto de grado presentado para la obtención del Grado de Licenciatura

POR: DANIA MARISOL QUISPE YANAHUAYA
TUTORA: LIC. ELIANA PATRICIA DUCHEN URIARTE

LA PAZ – BOLIVIA

Junio, 2022

DEDICATORIA

Por el camino de la sabiduría te he instruido, y por sendas de rectitud te he guiado.

Proverbios 4:11

A DIOS, por su inmenso amor, pues nada sería sin ÉL en mi vida, fue mi luz y guía en este proceso que concluyó.

A mis padres Leoncio Quispe y Clara Yanahuaya, quienes estuvieron desde el inicio, enseñándome a luchar por los sueños, gracias por sus consejos y paciencia.

A mis hermanas Janneth y Vania, quienes me acompañaron y apoyaron en cada sueño que tuve y me ayudaron a hacerlo realidad.

Dania Marisol Quispe Yanahuaya

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por un amor incondicional que aún no termino de comprender.

A mi familia, mis padres Leoncio y Clara, mis hermanas Janneth y Vania, por confiar y creer en mí, en todo momento.

A la Universidad Mayor De San Andrés, Facultad de Tecnología por acogerme en sus aulas durante esta etapa de mi vida, que me dejaron hermosos recuerdos y conocimientos para aplicar en la vida.

A la carrera de Química Industrial por la oportunidad de crecer profesionalmente y así ayudar a la sociedad.

A mi tutora Lic. Eliana Patricia Duchén Uriarte, por haberme enseñado el valor de la constancia y perseverancia en los sueños, por sus consejos, ánimos y sobre todo paciencia brindada.

A mis tribunales Lic. Marcelino Martínez Lazo y Lic. Pablo Pacohuanca Escalier, por su tiempo, dedicación y compartir sus conocimientos con mi persona, en el presente proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por su motivación, ánimo, compañía y sobre todo su alegría, en esta etapa concluida.

A todos quienes han sido parte de este plan perfecto para lograr que este sueño se hiciera realidad.

ÍNDICE GENERAL

<i>Índice general</i>	<i>i</i>
<i>Índice de cuadros</i>	<i>v</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de anexos</i>	<i>viii</i>
<i>Resumen</i>	<i>ix</i>
<i>Summary</i>	<i>x</i>

CAPÍTULO I. 1

GENERALIDADES 1

1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes	2
1.3. Planteamiento del problema	3
1.3.1. Árbol del problema	3
1.3.2. Formulación del problema.....	4
1.4. Justificación.....	4
1.4.1. Justificación científica	4
1.4.2. Justificación social.....	4
1.5. Objetivos	4
1.5.1. Objetivo general.....	4
1.5.2. Objetivos específicos	5
1.6. Alcance	5

CAPÍTULO II..... 6

FUNDAMENTO TEÓRICO 6

2.1. Moringa (<i>Moringa oleífera</i> Lam.).....	6
2.1.1. Origen	6
2.1.2. Distribución de la moringa	6
2.1.3. Características de la moringa.....	8
2.1.3.1. Clasificación taxonómica	8
2.1.3.2. Descripción botánica	8
2.1.3.3. Características morfológicas de la especie.....	9
2.1.3.4. Fenología.....	15

2.1.3.5.	Valor nutricional de las hojas de Moringa	15
2.1.3.6.	Composición química.....	17
2.1.3.7.	Propiedades biológicas estudiadas de la planta.....	19
2.1.3.8.	Usos de la Moringa oleífera	20
2.1.3.8.1.	Usos industriales.....	20
2.1.3.8.2.	Usos medicinales	21
2.1.3.9.	Toxicidad de las hojas	23
2.2.	Metabolitos	24
2.2.1.	Metabolitos primarios	24
2.2.2.	Metabolitos secundarios	24
2.2.2.1.	Terpenos o terpenoides.....	26
2.2.2.2.	Alcaloides.....	26
2.2.2.3.	Compuestos fenólicos	26
2.2.2.3.1.	Flavonoides.....	27
2.3.	Tamizaje fitoquímico	35
2.3.1.	Reacciones de identificación de compuestos fenólicos	35
2.3.1.1.	Ensayo de cloruro férrico	36
2.3.1.2.	Ensayo de Shinoda	36
2.3.1.3.	Ensayo con álcalis	37
2.4.	Cromatografía.....	37
2.5.	Técnicas de análisis	38
2.5.1.	Espectrofotometría UV-visible.....	38
2.6.	Actividad antioxidante	39
2.6.1.	Ensayo de decoloración del radical 1,1–difeníl-2-picril-hidrazilo (DPPH*) ..	41
2.6.2.	Ensayo de decoloración con el radical catiónico Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS*+)	42
2.7.	Determinación de fenoles totales	44
2.8.	Determinación de flavonoides totales	45
2.9.	Producto aplicativo.....	46
2.9.1.	Gel	46
2.9.2.	Control de calidad del producto terminado	47
CAPÍTULO III.	48
PARTE EXPERIMENTAL	48

3.1. Materiales	48
3.1.1. Material vegetal	48
3.1.2. Material de laboratorio	49
3.2. Metodología.....	51
3.2.1. Tratamiento de la muestra.....	52
3.2.2. Obtención de extractos	52
3.2.2.1. Extracción no polar	52
3.2.2.2. Extracción por solventes	54
3.2.2.2.1. Comparación de extractos	56
3.2.2.2.2. Análisis fitoquímico (flujograma)	57
3.2.3. Separación de flavonoides totales.....	59
3.2.3.1. Separación de compuestos del extracto etanólico	59
3.2.3.1.1. Aislamiento de azúcares	59
3.2.3.1.2. Separación y purificación de flavonoides totales por cromatografía .	61
3.2.4. Cuantificación del extracto purificado.....	63
3.2.4.1. Espectroscopia UV – visible del extracto purificado	63
3.2.4.2. Determinación de actividad antioxidante.....	64
3.2.4.3. Determinación de flavonoides totales por el método de AlCl ₃	66
3.2.5. Formulación del producto.....	66
3.2.5.1. Formulación del gel.....	66
3.2.5.2. Control de calidad del producto formulado.....	67
3.2.5.2.1. Determinación organoléptica del gel.....	67
3.2.5.2.2. Determinación del pH.....	67
3.2.5.2.3. Determinación de extensibilidad	67
3.2.5.2.4. Determinación de untuosidad	67
CAPÍTULO IV.....	68
RESULTADOS.....	68
4.1. Rendimiento de extractos obtenidos.....	68
4.2. Comparación de extractos	68
4.3. Pruebas cualitativas de los diferentes extractos.....	69
4.4. Separación de flavonoides totales	73
4.4.1. Separación de azucares presentes	73

4.4.2. Separación y purificación de flavonoides totales	74
4.4.2.1. Pruebas de solubilidad.....	74
4.4.2.2. Separación de los compuestos por cromatografía	75
4.5. Analisis del compuesto purificado	76
4.5.1. Espectroscopia UV-Visble del extracto purificado	76
4.5.2. Determinación de actividad antioxidante	77
4.5.2.1. Determinación por el método DPPH.....	77
4.5.2.2. Determinación por el método ABTS.....	77
4.5.2.3. Determinación por el método Follin Denis	78
4.5.3. Determinacion de flavonoides totales.....	79
4.6. Formulación del producto	80
4.6.1. Formulacion del gel	80
4.6.2. Control de calidad del producto terminado	82
4.6.2.1. Análisis organoléptico.....	82
4.6.2.2. Determinación de pH	83
4.6.2.3. Determinación de extensibilidad.....	83
4.6.2.4. Determinación de untuosidad.....	84
CAPÍTULO V.....	85
CONCLUSIONES	85
CAPÍTULO VI.....	86
RECOMENDACIONES	86
CAPÍTULO VII.....	87
BIBLIOGRAFÍA	87
CAPÍTULO VIII.	92
ANEXOS	92

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de vitaminas y minerales de la hoja de moringa.....	16
Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en las hojas de moringa.....	16
Cuadro 3. Comparación con otros alimentos	17
Cuadro 4. Componentes químicos de las diferentes partes de la Moringa	17
Cuadro 5. Contenido nutricional de las hojas frescas, vainas maduras y semillas	18
Cuadro 6. Contenido de hojas secas de <i>Moringa oleífera</i>	19
Cuadro 7. Propiedades descritas de Moringa en los diferentes estudios realizados	19
Cuadro 8. Usos en los países de las hojas de Moringa.....	22
Cuadro 9. Clasificación de los flavonoides por variación estructural.....	29
Cuadro 10. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides	34
Cuadro 11. Longitudes de onda según el color	39
Cuadro 12. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT	41
Cuadro 13. Ventajas y desventajas de los geles	46
Cuadro 14. Porcentaje de rendimiento de las extracciones (% P/P)	68
Cuadro 15. Pruebas fitoquímicas del extracto metanólico.....	70
Cuadro 16. Pruebas fitoquímicas del extracto etanólico.....	71
Cuadro 17. Pruebas fitoquímicas del extracto acetato de etilo	72
Cuadro 18. Porcentaje de inhibición a diferentes diluciones por método DPPH.....	77
Cuadro 19. Porcentaje de inhibición a diferentes diluciones para método ABTS	77
Cuadro 20. Absorbancias promedio a diferentes diluciones para fenoles totales	78
Cuadro 21. Absorbancias a diferentes diluciones para flavonoides totales	79
Cuadro 22. Propuestas de formulaciones a diferentes porcentajes	80
Cuadro 23. Descripción de las diferentes formulaciones.....	80
Cuadro 24. Formulación del gel.....	81
Cuadro 25. Resultados del análisis organoléptico al producto	82
Cuadro 26. Resultados del pH al producto.....	83
Cuadro 27. Resultados de la extensibilidad del producto.	83
Cuadro 28. Resultados de untuosidad del producto	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de distribución natural de la moringa.....	7
Figura 2. Área de distribución natural de la moringa.....	7
Figura 3. Plantas de Moringa.....	10
Figura 4. Hojas de la Moringa.....	11
Figura 5. Hojas de la Moringa.....	12
Figura 6. Fruto de la Moringa.....	12
Figura 7. Semilla de la Moringa.....	13
Figura 8. Tallo de la Moringa.....	14
Figura 9. Raíz típica de la Moringa.....	14
Figura 10. Usos potenciales de la moringa.....	21
Figura 11. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.....	25
Figura 12. Estructura química del fenol.....	27
Figura 13. Esquema de clasificación de compuestos fenólicos.....	27
Figura 14. Secuencia de flavonoides C6 – C3 – C6.....	28
Figura 15. Reacción de Shinoda.....	36
Figura 16. Cromatografía de capa fina.....	38
Figura 17. Espectro electromagnético.....	39
Figura 18. Como los antioxidantes reducen a los radicales libres.....	40
Figura 19. Estructura del DPPH* antes y después de la reacción con el antioxidante.....	42
Figura 20. Estructura del ABTS*+ antes y después de la reacción con el antioxidante.....	43
Figura 21. Mecanismo de acción del reactivo de Folin – Ciocalteu.....	44
Figura 22. Complejo flavonoide-Aluminio.....	45
Figura 23. Muestra de hojas de moringa.....	48
Figura 24. Pesaje de las muestras de moringa.....	48
Figura 25. Diagrama del procedimiento seguido.....	51
Figura 26. Destilación fraccionada del éter de petróleo a partir de gasolina.....	52
Figura 27. Extracción no polar.....	53
Figura 28. Concentración del extracto en el rotaevaporador.....	54
Figura 29. Evaporación del solvente de la muestra vegetal.....	54

Figura 30. Filtración de los extractos	55
Figura 31. Proceso de concentración de extractos.....	55
Figura 32. Muestras de los extractos con diferentes solventes.....	56
Figura 33. Cromatografía de los diferentes extractos.....	56
Figura 34. Diagrama de análisis fitoquímico	57
Figura 35. Pruebas fitoquímicas de los diferentes extractos	58
Figura 36. Proceso de separación de cristales	59
Figura 37. Proceso de separación de cristales	60
Figura 38. Cromatografía comparativa de azúcares	60
Figura 39. Separación por precipitación de la muestra	61
Figura 40. Cromatografía en columna del extracto etanólico	61
Figura 41. Fracciones del extracto separado	62
Figura 42. Placa de las fracciones obtenidas del extracto etanólico.....	62
Figura 43. Purificación de la fracción extraída	63
Figura 44. Pruebas cualitativas de la fracción purificada.....	63
Figura 45. Espectro de la fracción purificada 1:10000.....	64
Figura 46. Método de Folin-Denis	65
Figura 47. Placa cromatográfica de los diferentes extractos con luz UV.....	69
Figura 48. Cromatografía en capa fina de los azúcares separados	73
Figura 49. Pruebas de solubilidad al extracto etanólico.....	74
Figura 50. Precipitado formado por la mezcla de acetato de etilo y extracto etanólico.....	74
Figura 51. Placa cromatográfica de las fracciones obtenidas en columna.	75
Figura 52. Purificación de los flavonoides totales	76
Figura 53. Espectro del extracto purificado	76
Figura 54. Curva de calibración para fenoles totales con pirogalol	78
Figura 55. Curva de calibración para flavonoides totales con quercetina.....	79
Figura 56. Formulaciones propuestas para el gel	81
Figura 57. Formulación final con el extracto purificado.....	82
Figura 58. Extensibilidad del producto.	84
Figura 59. Untuosidad del producto	84

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los reactivos y curva del método DPPH	92
Anexo 2. Preparación de los reactivos y curva del método ABTS	92
Anexo 3. Preparación de los reactivos y curva del método Folin-Denis	92
Anexo 4. Preparación de los reactivos y curva del método AlCl ₃	93
Anexo 5. Datos experimentales para la determinación de rendimiento en extractos.....	93
Anexo 6. Datos experimentales para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH	94
Anexo 7. Datos experimentales para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH	94
Anexo 8. Datos experimentales para la curva de calibración de fenoles totales con pirogalol	95
Anexo 9. Datos experimentales de la muestra en la determinación de fenoles totales	96
Anexo 10. Datos experimentales para la curva de calibración para flavonoides totales con Quercetina.....	96
Anexo 11. Datos experimentales de la muestra en la determinación de flavonoides totales.	97

RESUMEN

El presente trabajo consistió en realizar a partir de las hojas de Moringa oleífera recolectadas en los mercados de La Paz, una extracción con solventes de diferente polaridad, posteriormente se realizó la selección del extracto mayoritario a partir de un análisis fitoquímico y cromatográfico, para realizar una separación y purificación de flavonoides totales presentes en este extracto de las hojas de moringa, cuantificando luego la actividad antioxidante del extracto purificado mediante diversas técnicas y métodos estandarizados por espectroscopia UV-Visible como: ABTS, DPPH y fenoles totales; también la cuantificación de flavonoides totales. Con este extracto se realizó una propuesta de formulación de un gel analgésico, que fue analizado con pruebas de control de calidad básicas

SUMMARY

The present work consisted in carrying out, from the leaves of *Moringa oleifera* collected in the markets of La Paz, an extraction with solvents of different polarity, later the selection of the majority extract was carried out from a phytochemical and chromatographic analysis, to carry out a separation and purification of total flavonoids present in this extract from moringa leaves, then quantifying the antioxidant activity of the purified extract through various techniques and standardized methods by UV-Visible spectroscopy such as: ABTS, DPPH and total phenols; also the quantification of total flavonoids. With this extract, a proposal for the formulation of an analgesic gel was made, which was analyzed with basic quality control tests.

CAPÍTULO I.

GENERALIDADES

1.1. Introducción

Con el paso de los años el ser humano ha ido aprovechando las propiedades de la materia vegetal como alimento, remedios para dolores e incluso para recuperación del “espíritu” de una forma empírica, pasando los conocimientos de generación en generación a través de la palabra, hasta un punto donde el hombre cuestionó el efecto real de las plantas como remedios naturales.

Muchas de las especies vegetales eran valoradas por sus propiedades curativas en culturas poderosas sin saber en ese momento el porqué de sus efectos, más tarde se empezó a utilizar en forma de infusiones, bálsamos y otros, es así que el hombre inicia su investigación de los beneficios de las plantas como materia prima.

Uno de estos casos es la planta de *Moringa oleífera*, árbol perteneciente a la familia Moringaceae, es nativo de las estribaciones meridionales del Himalaya y en la actualidad se cultiva prácticamente en todas las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo. (Foild, 2001).

Esta planta cuenta con múltiples beneficios, entre ellos ayuda a resolver problemas de seguridad alimentaria y prevenir múltiples patologías asociadas a deficiencias de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas así lo manifiestan autores como Aragón & Herrera (2016). Siendo útiles todas las estructuras de la planta tanto a nivel nutricional como medicinal, hojas, tallo, flores y semillas son comestibles, de sabor agradable, que se pueden consumir crudas o cocinadas. las vainas son utilizadas como alimento, fertilizantes y poseen propiedades medicinales.

En el presente trabajo se identificó los compuestos beneficiosos que posee las hojas de *Moringa*, para lo cual se requirió del análisis fitoquímico, que comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, los cuales pueden ser fenoles y polifenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, glucósidos y saponinas (Prashant, 2011)

Una vez identificadas pueden ser utilizadas en diversas áreas como, por ejemplo:

- Medicina y farmacia (anticancerígeno, antibiótica)
- Insecticidas
- En la industria alimentaria (conservantes, pigmentos)
- En la industria cosmética (esencias, colorantes)

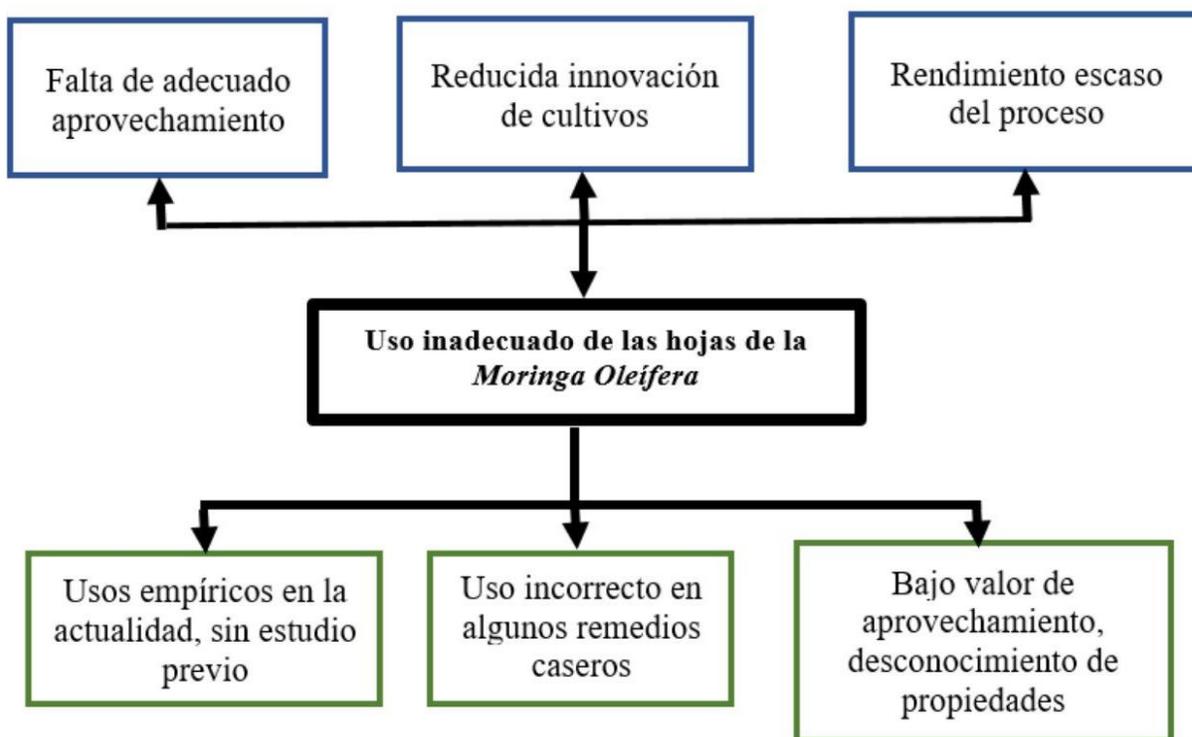
1.2. Antecedentes

- Oviedo & Escobar (2020), indican que la *Moringa oleífera* Lam. fue introducida en Colombia, de donde fue recolecta para el estudio de las hojas fresas, semillas y raíces, con diferentes métodos de extracciones y solventes de diferente polaridad, fueron evaluados en cromatografía de capa delgada (CCD), a partir de esta evaluación se estableció la actividad antibacterial de cada muestra y así se formuló un gel con el extracto etanólico seleccionado por sus resultados, en percolación en frío, presentando finalmente el procedimiento y diseño de planta piloto con los costos de producción.
- Doménech Asensi *et al.* (2017), indican que la *Moringa oleífera* tiene la capacidad de adaptación en climas calurosos y pluviometrías escasas, el consumo de diferentes partes de esta planta es común por el elevado poder nutritivo en la lucha contra la desnutrición, también produce efectos saludables como antioxidante y antiinflamatorio o bactericida, esta planta se incorporó a los alimentos como panadería por el alto poder nutricional en zonas de riesgo por desnutrición.
- Aragón & Herrera (2016), indica que la semilla de *Moringa oleífera* puede ser alimento alternativo para el engorde de pollos, por ello se evaluó de manera semanal el peso y consumo de los animales, teniendo el alimento dosificado de la semilla y se comparó con aditivos vitamínicos, se concluyó que es una opción viable por el gasto mínimo generado.
- Gómez Gómez (2013), indica que a partir de la semilla de *Moringa oleífera* se extrajeron fracciones solubles por decocción en solventes de diferente polaridad, demostrando que el porcentaje de mayor rendimiento es en agua, a los extractos se realizaron el respectivo tamizaje fitoquímico y cromatografía, evidenciando la presencia de mayor cantidad de metabolitos secundarios está en el extracto metanólico, finalmente se hizo un estudio histológico de la semilla evidenciando la presencia de aceites esenciales, alcaloides y almidones.

- García (2017), indica que el estudio buscó la comparación de actividad antioxidante y compuestos fenólicos en las hojas de Moringa en polvo, que fueron extraídos por diferentes solventes, los fenoles totales fueron medidos por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por espectrofotometría, los resultados proyectaron una relación alta entre la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos.
- Nattes & Quispe (2018), indican que las semillas de Ayrapmu poseen metabolitos secundarios, que fueron extraídos con solventes polares como agua y etanol, posteriormente se realizó el estudio fitoquímico y la cuantificación de actividad antioxidante y flavonoides totales, así también se realizaron las pruebas antibacterianas por la prueba de Kirby-Bauer, para finalmente seleccionar el extracto adecuado en la formulación de producto.

1.3. Planteamiento del problema

1.3.1. Árbol del problema



1.3.2. Formulación del problema

El porcentaje de cultivo en Bolivia de la *Moringa oleífera*, en estos últimos años ha aumentado en un porcentaje bajo, a pesar sus múltiples beneficios que tiene la planta, además existe el desconcierto en la población respecto de los métodos de empleo para su consumo y uso medicinal según el beneficio que se desea. Debido a que se basan mayormente en usos empíricos pueden ocasionar un inadecuado manejo y aplicación, es así que esta planta no cuenta con un estudio de completo de los compuestos presentes y sus efectos secundarios que ocasiona al momento de la aplicación, aspecto que debe ser manejado con precaución para el consumo y uso en algunos casos en forma directa.

1.4. Justificación

1.4.1. Justificación científica

El estudio y conocimiento de los metabolitos secundarios para la generación de productos naturales de beneficio para el hombre a partir de la aplicación de técnicas y métodos de análisis, para la determinación de estructuras moleculares a través de la separación, hace que se tenga un análisis óptimo y exhaustivo de las hojas de moringa. Este trabajo contribuirá a un mejor aprovechamiento de la composición de las hojas de esta planta para un aprovechamiento tecnológico, por medio de una propuesta de formulación.

1.4.2. Justificación social

El cultivo de la moringa en regiones tropicales como la amazonia boliviana, presenta un gran beneficio para las familias que viven en esta región por las condiciones óptimas con las que cuentan para el cultivo, por tanto, puede aprovechar sus beneficios de forma correcta y amplia, con el análisis fitoquímico de los metabolitos secundarios en el mismo entorno social.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Realizar la extracción de los flavonoides mayoritarios presentes en las hojas de la especie *Moringa oleífera* (Lam) y su posterior evaluación antioxidante para la formulación de un producto natural.

1.5.2. Objetivos específicos

- Realizar la extracción de las hojas de Moringa oleífera en solventes con diferente polaridad a través de una extracción sólido-líquido.
- Realizar la cromatografía en columna para la separación de flavonoides totales del extracto mayoritario.
- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos separados del extracto mayoritario.
- Elaborar una formulación terapéutica a partir del extracto con mayor presencia de flavonoides de las hojas de Moringa como ensayo.

1.6. Alcance

Obtener una fracción purificada de flavonoides totales, a partir del extracto de las hojas de Moringa oleífera (Lam) y formular una propuesta de producto analgésico.

CAPÍTULO II.

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Moringa (*Moringa oleífera* Lam.)

2.1.1. Origen

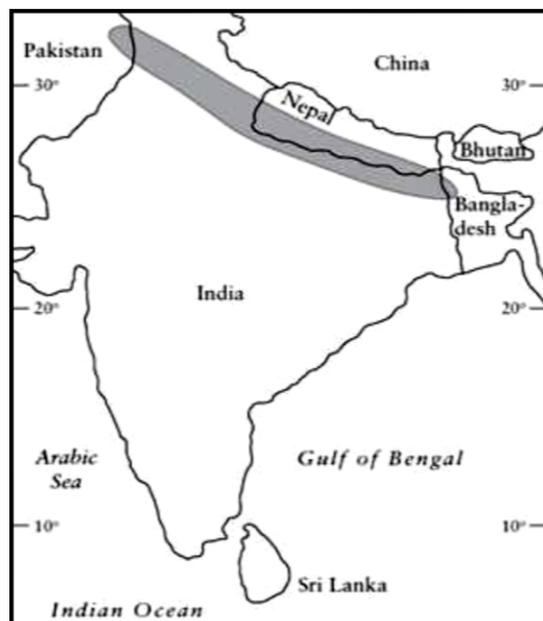
Aragón y Herrera (2016), mencionan que la moringa es originaria del Medio Oriente, en el sur del Himalaya, noroeste de India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán, a partir de estos lugares se expandió en gran parte del planeta. La introducción en América fue cerca del año 1920, como una planta ornamental, especialmente para las cercas vivas, su crecimiento puede darse hasta los 1800 metros sobre el nivel del mar.

Esta planta es conocido en gran parte del mundo con varios nombres según el idioma y países, entre los nombres nativos se tiene: *árbol del ben*, *ben*, *morango*, *moringa* (español); *horseradish tree*, *radish tree*, *drumstick tree*, *mother's best friend*, *West Indian ben* (inglés); *bèn ailé*, *benzolive* (francés); *behenbaum* (alemán); *sándalo cerúleo* (italiano); *moringuiero*, *acácia branca* (portugués); *cedro* (Brasil); *la-banyu* (Burkina Faso); *paizlava* (Camerún); *mlonge* (Kenia); *Sitachini* (Nepal); *Saijan*, *Sohanjna* (Pakistán); *angela* (Colombia); *marango*, *marangon* (Costa Rica); *acacia*, *ben* (Cuba); *ceiba* (El Salvador); *perla*, *perlas*, *paraíso blanco* (Guatemala); *marango*, *maranjo* (Guatemala); *ben*, *la libertad* (República Dominicana); entre otros (Arias, 2014).

2.1.2. Distribución de la moringa

Esta planta es originaria del norte de la India con más de 750 estudios relacionados a su investigación ha tenido una gran distribución mundial siendo de gran ayuda para el desarrollo económico, en el ámbito nutricional y energético de animales y seres humanos (Aragón & Herrera, 2016).

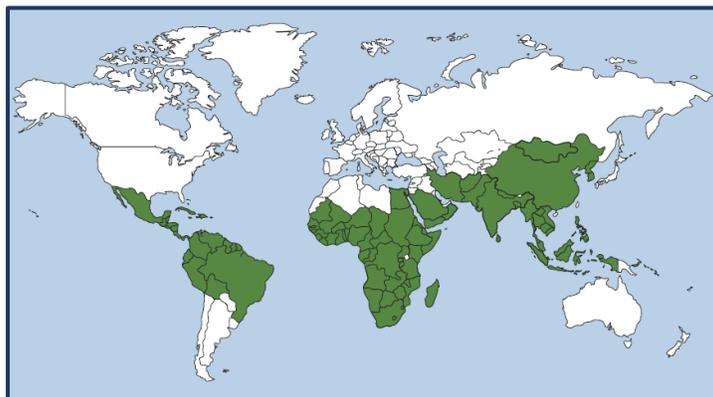
El área de distribución natural de la *Moringa oleífera* es muy restringida. Lo que no significa que sea una especie estenoica, pues posee una gran capacidad de adaptación ecológica. Es una especie originaria del sur del Himalaya, donde crece desde el noreste de Pakistán (33 °N 73 °E), atravesando Nepal y norte de la India, hasta el noroeste de Bangladesh así como se observa en la figura 1 (Arias, 2014).



Fuente: Parrota citado por Aragón & Herrera (2016)

Figura 1. Área de distribución natural de la moringa.

Pérez citado por Arias (2014) manifiesta que la moringa en la actualidad se encuentra diseminada en gran parte del planeta. En zonas de clima cálido delimitadas entre el trópico de Cáncer y el de Capricornio. Como se observa en la figura 2, este cultivo se ha establecido en diversas regiones del mundo.



Fuente: Uquillas Almeida (2017)

Figura 2. Área de distribución natural de la moringa

Como se puede evidenciar que, en Sud América, existe la presencia de esta especie. Se hizo la reconstrucción con la siembra en Haití. En Neiva, Colombia se entregaron miles de plantas a la población. En ICA-Perú, se sembraron alrededor de 500 hectáreas para combatir la desnutrición en la población (Uquillas Almeida, 2017).

2.1.3. Características de la moringa

2.1.3.1. Clasificación taxonómica

Según APG III (Angiosperm Phylogeny Group) del año 2005 (Balbir citado por Gómez Gómez, 2013 y Uquillas Almeida, 2017), la clasificación taxonómica de esta especie es la siguiente:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Subclase	Dilleniidae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Capparidales
Familia	Moringaceae
Género	Moringácea
Especie	Moringa oleífera
Nombre Científico	<i>Moringa oleífera</i> Lam.
Variedades	M. Arbórea, M. Borziana, M. Concanensis, M. Drouhardii, M. Hildebrandtii, M. Longituba, M. Ovalifolia, M. Peregrina, M. Pygmaea, M. Rivae, M. Ruspoliana y M. Stenopetala

2.1.3.2. Descripción botánica

La familia de Moringaceas tiene árboles que se caracterizan por tener una hoja caediza y un tallo de corteza gomosa, además de ramas jóvenes pelosas, con tricomas de hasta 0,3 mm, erectos y crespos. El árbol tiene un crecimiento rápido y alcanza hasta los 12 metros de altura, con un promedio de vida de 20 años (Arias, 2014).

Entre otra de las características se tiene una capacidad de resistencia a la sequía y potencial agronómico, por eso se puede cultivar en región áridas y semiáridas, esto es importante debido a las condiciones climáticas actuales. (García Fayos citado por Sánchez Peña *et al.* 2013). Entre los parámetros a evaluar para la identificación de los mejores árboles se

considera la abundancia de sus flores y el desarrollo que ha tenido (Uquillas Almeida, 2017).

Olson, Carlquist, Pérez citado por Arias (2014). Manifiesta que las especies de este género se clasifica en tres grupos según su forma de vida, caracteres morfológicos y área de distribución de la siguiente forma:

- **Boottle tree (árbol botella):** Proviene de África y Madagascar, son troncos gruesos como el baobal y sus flores poseen una simetría radial, está conformado por cuatro especies:
 - *Moringa drouhardii* jum
 - *Moringa hildebrandtii* engl
 - *Moringa ovalifolia* dinter ex benger
 - *Moringa stenopetala*
- **Slender trees (arboles esbeltos):** Presentan fibras libriformes en las raíces (más resistentes del género). Las flores presentan simetría bilateral, están formados por:
 - *Moringa oleífera*
 - *Moringa concanensis* Nimm
 - *Moringa peregrina* forssk ex. fiori
- **Sarcorhizal tree y los shrubs (arbustos tuberosos):** Tienen similitud anatómica entre ellas, están formados por:
 - *Moringa borziana* matt
 - *Moringa longituba* engl
 - *Moringa pygmaea* verd
 - *Moringa rivae* chiov

De todas las especies de la familia Moringaceae, la especie *Moringa Oleífera* tiene la mayor distribución y naturalizada en más países (Anwar *et al.* citado por Arias, 2014).

2.1.3.3. Características morfológicas de la especie

La planta de moringa es un arbusto pequeño con una copa abierta (tipo paraguas), así como se observa en la figura 3, se caracteriza por tener una altura entre 5 a 10 metros y en la madurez llega hasta los 12 metros, cuenta con un tronco poco torcido de 25 a 30 centímetros de diámetro, crece rápido y resistente a la sequía (Gómez Gómez, 2013) su

temperatura ideal para un crecimiento óptimo del árbol es de 25 a 35°C, aunque puede tolerar hasta 48°C (Doménech Asensi *et al.*, 2017).



Fuente: Uquillas Almeida (2017)

Figura 3. Plantas de Moringa

Su corteza es de color marrón claro, lisa o finamente rugosa con un sabor picante como la del rábano. La corteza del tallo es gruesa, corchosa de color gris blanquecino (Estrada-Hernández *et al.*, 2016).

Hojas

Presentan hojas del tipo compuestas y se agrupan en foliolos con 5 pares acomodados sobre el peciolo principal y un folio en la parte terminal, como se ve en la figura 4, los foliolos contienen laminas foliares ovaladas de un área de 200 mm² y tienen una longitud de 30 a 70 cm (Gómez Gómez, 2013), asimismo las hojas formadas doble o triplemente pinnadas, con foliolos opuestos y sin estípulas (Arias, 2014).



Fuente: Uquillas Almeida (2017)

Figura 4. Hojas de la Moringa

Como se puede observar en la figura 4 las hojas son pinnadas compuestas por folíolos unidos al raquis; se caracterizan por el alto contenido de nutrientes, aminoácidos esenciales y aceite. (Estrada-Hernández *et al.*, 2016).

Flores

Posee flores que están formadas por cinco sépalos desiguales, patentes, reflexos, imbricados, y cinco pétalos blancos, con algún matiz rosa o rojo, desiguales, los dos superiores más pequeños; disco con margen entero; estambres insertados en el borde del disco, con filamentos libres y anteras uniloculares, dorsifijas, dobladas hacia abajo, y oblongas; ovario estipitado, lanceolado, unilocular con multitud de óvulos en dos series, fijos en tres placentas parietales; estilo truncado en el ápice (Pérez citado por Arias 2014).

Las flores son bisexuales de color blanco de 2.5 cm de diámetro y 2 cm de largo con estambres de color amarillo como se observa en la figura 5 (Falasca y Bernabé citado por Estrada-Hernández *et al.*, 2016).



Fuente: Uquillas Almeida (2017)

Figura 5. Hojas de la Moringa

En regiones atemperadas florecen solo una vez al año, pero existe casos de floración de dos veces por año, diferenciado por la variación de cambio en temperatura y precipitación. En el caso de mantenerse las características climáticas florece una vez y si varia florece más veces (Estrada-Hernández *et al.*, 2016).

Fruto

El fruto es una cápsula larga y dehiscente, leñosa, tras abrirse, se separa en tres valvas longitudinales con varias semillas con tres alas o no aladas (Arias, 2014). Cuando están frescas presentan textura fibrosa y humectada, ligeramente dulce pero irritante (Uquillas Almeida, 2017).



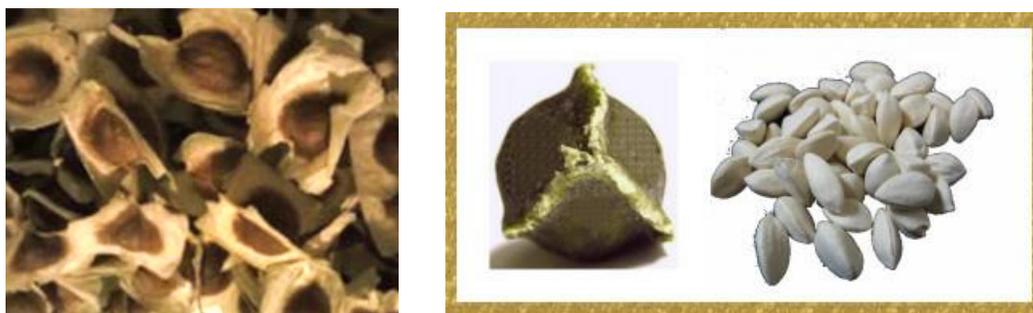
Fuente: Uquillas Almeida (2017)

Figura 6. Fruto de la Moringa

Como se observa en la figura 6 el fruto tiene una forma lineal de grosor de 1 a 2 cm, conformada por lígulas compuestas por 12 a 25 semillas de forma longitudinal por vaina en frutos pequeños a medianos. Se encuentra en cápsula, trivalvado, fusiforme, rostrado (Arias, 2014). El fruto es una vaina leñosa que puede medir de 20 a 45 cm de largo compuesta por tres valvas (Ramos *et al.* citado por Estrada-Hernández *et al.*, 2016).

Semillas

Las semillas se caracterizan por ser aladas y carnosas, su tamaño oscila entre los 2,5 a 3 cm de largo, se cubren con una cascara color café (Figura 7), por dentro se observa el endospermo blanco y muy oleaginoso así lo mencionan Foild *et al.*, Lamarck, citado por Arias, (2014). Tiene una forma redonda y poseen tres crestas papiráceas. (Uquillas Almeida, 2017).



Fuente: Estrada-Hernández *et al.*, 2016 y Uquillas Almeida, 2017

Figura 7. Semilla de la Moringa

La semilla de moringa tiene un 40% de aceite, y el perfil de ácido graso del aceite indica un 73% de ácido oleico, esto significa que el aceite de moringa tiene el mismo nivel de calidad del aceite de oliva (Folkard, Sutherland citado por Enriquez Espinoza *et al.*, 2013).

Una vez realizada la siembra los brotes salen a los 10 días posteriores, con el riesgo del ataque de plagas como hormigas, zompopos, orugas géométras y el gusano, quienes ocasionan invasión en la planta (Uquillas Almeida, 2017).

Tallo

Según lo reportado por Uquillas Almeida, (2017), los tallos en los primeros años se caracterizan por ser rectos, delgados y flexibles, pero tras el paso del tiempo se convierten en leñosos y fuertes.



Fuente: Estrada-Hernández et al., 2016

Figura 8. Tallo de la Moringa

La corteza es blanquecina (Figura 8), el tronco generalmente espeso e irregular en tamaño y forma; la corona es pequeña y es densa, muy pocas veces excede los 10 metros de altura (Apaza Cora, 2016; Uquillas Almeida, 2017).

Raíz

Las plántulas desarrollan una tuberosa que es la raíz principal hinchada blanca la misma tiene un olor acre característico (Figura 9), escasa respecto a raíces laterales. (Apaza Cora, 2016).



Fuente: Estrada-Hernández et al., 2016

Figura 9. Raíz típica de la Moringa

La raíz principal es de tipo pivotante y globosa, su gran tamaño permite cierta resistencia a la sequía, al realizar algún corte se produce una goma de color rojizo parduzco (Uquillas Almeida, 2017).

2.1.3.4. Fenología

La fenología varía por factores como la localización y variedad de la especie, es iniciado entre los primeros meses hasta el primer año tras su plantación. La propagación se puede dar con facilidad por semilla y material vegetativo, siendo este último el más óptimo por estacas. Las semillas carecen de periodo de latencia, estando maduras conservando la capacidad germinativa hasta por un año (Arias, 2014).

El porcentaje de germinación está en función de la temperatura, el sustrato, condiciones de luz, el tiempo o las condiciones de almacenamiento, pero de forma general germina entre cinco y quince días, también existe métodos para elevar el rendimiento como sumergir en agua 24 horas antes y otros. El sistema de reproducción varía entre polinización cruzada (74%) y autopolinización (26%) (Arias, 2014). La misma autora menciona respecto al crecimiento, que existe una variación según las condiciones de temperatura y humedad:

- Según Odee (1998) existe algunos que miden 6 a 7 metros de altura, con una precipitación anual menor a 400mm.
- Parrota (1993) indica que las condiciones óptimas hacen que crezca de uno a dos metros por año durante los cuatro primeros años.
- Mientras Medina et. Al. (2007) menciona un crecimiento de dos metros a sus ocho meses

Una característica fundamental de su riego es que puede ser regada con aguas de desechos, convirtiéndola en una especie apta para el aprovechamiento de aguas sin depurar, hasta casos de las aguas residuales (Uquillas Almeida, 2017).

La moringa es poco longeva, puede vivir 20 años, además tiene un crecimiento rápido es así que a la vez hace un gran aporte al suelo, protegiendo de factores externos como la erosión, la desecación y las altas temperaturas. (Falasca & Bernabé, citado por Arias, 2014).

2.1.3.5. Valor nutricional de las hojas de Moringa

El contenido de las hojas muestra una cantidad de nutrientes esenciales que evitan enfermedades, además de todos los aminoácidos esenciales que se presenta en los cuadros

1, 2 y 3 (Gómez Gómez, 2013), estos contenidos están sujetos a leves cambios que está en función de la variedad, estación, clima y condición de suelo que es cultivada la planta.

Cuadro 1. Contenido de vitaminas y minerales de la hoja de moringa

Contenido	Hojas frescas (mg)	Hojas secas (mg)
Caroteno (vitamina A)	6,78	18,90
Tiamina (B1)	0,06	2,64
Riboflavina (B2)	0,05	20,50
Niacina (B3)	0,80	8,20
Vitamina C	220,00	17,30
Calcio	440,00	2003,00
Carbohidratos	12500,00	38200,00
Cobre	0,07	0,57
Grasa	1700,00	2300,00
Fibra	900,00	19,20
Hierro	0,85	28,20
Magnesio	42,00	368,00
Fosforo	70,00	204,00
Potasio	259,00	1324,00
Proteína	6700,00	27100,00
Zinc	0,16	3,28

Fuente: Balbir, citado por Gómez Gómez, (2013)

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en las hojas de moringa

Contenido	Hojas frescas (mg)	Hojas secas (mg)
Arginina	406,6	1325,0
Histidina	149,8	613,0
Isoleucina	299,6	825,0
Leucina	492,2	1950,0
Lisina	342,4	1325,0
Metionina	117,7	350,0

Fenilalanina	310,3	1388,0
Treonina	117,7	1188,0
Triptófano	107,0	425,0
Valina	374,5	1063,0

Fuente: Balbir, citado por Gómez Gómez, 2013; Mathur citado por Sánchez Peña et al., 2013

Cuadro 3. Comparación con otros alimentos

Compuesto	Alimento	Hojas de moringa
Vitamina A	Zanahoria	10 veces más
Vitamina C	Naranja	0,5 veces más
Calcio	Leche	17 veces más
Potasio	Plátano	15 veces más
Hierro	Espinaca	25 veces más
Proteína	Yogurt	9 veces más

Comparación con alimentos en gramos (g)

Fuente: Mathur citado por Sánchez Peña et al., (2013)

2.1.3.6. Composición química

La planta completa de la Moringa oleífera tiene propiedades aprovechadas por el ser humano, por la presencia de compuestos reconocidos en cada parte del árbol. En el trabajo realizado por Gómez Gómez, (2013), se registraron los componentes presentados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Componentes químicos de las diferentes partes de la Moringa

Componente químico	Semilla	Tallo	Hoja	Flor	Raíz	Corteza
4(α -L-ramnosil) bencilisotiocianato	X					
Ácidos grasos	X					
Afomina						

Alcaloide (moringenina)		X		
Aminoácidos			X	X
Basorina		X		
Dextrina		X		
Enzimas (emulsina, mirosina)		X		
Espiraquina				X
Glicósidos (moringina)	X			
Gomas				X
Pterigospemina	X			X
Quercetina			X	X
Trazas de alcaloides	X			X
Vitaminas y minerales	X		X	X
B-sitosterol				X

Fuente: Gómez Gómez, (2013)

Estudios realizados, respecto al valor nutricional y usos alimenticios de las hojas, vainas y semillas indican valores de macro y micronutrientes que la caracterizan como una fuente alimentaria de proteínas, grasa, calcio, potasio, hierro, caroterol, vitamina C, entre otros (Cuadro 5). Los estudios confirman que la planta puede ser aprovechada con fines nutricionales (Enriquez Espinoza *et al.*, 2013).

Cuadro 5. Contenido nutricional de las hojas frescas, vainas maduras y semillas

Análisis Proximal	Hojas frescas	Vainas	Semillas
Humedad (%)	79,72	75,8	47,2
Proteínas (%)	5,52	7,1	17,5
Grasas (%)	1,46	1,8	15,1
Cenizas (%)	2,12	1,1	2,1
Carbohidratos (%)	11,14	14,3	18,1

Energía (kcal/100g)	207,42	226	439
Calcio (mg/100g)	22,32	2,1	3,4
Potasio (mg/100g)	11,84	12,8	18,3
Hierro (mg/100g)	24,26	1,6	7,1
Carotenos (ug/100g)	3911,52	3327,7	114,4
Vitamina C (mg/100g)	109,3	0,1	0,1

Fuente: Enriquez Espinoza et al. (2013)

En cuanto a las hojas secas su contenido se refleja a continuación en porcentaje:

Cuadro 6. Contenido de hojas secas de *Moringa oleífera*

Contenido	Porcentaje (%)
Humedad	8,4
Cenizas	12,5
Nitrógeno total	3,3
Proteínas	20,6
Fibra cruda	3,8
Extracto etéreo	9,0
Extracto no nitrogenado	45,6

Fuente: Cáceres citado por Gómez Gómez (2013)

2.1.3.7. Propiedades biológicas estudiadas de la planta

Los últimos años han aumentado los estudios referidos a las distintas actividades de los compuestos presentes en diferentes partes de la *Moringa oleífera*. El cuadro 7 presenta resultados de estudios recientes que presentan las actividades biológicas de los compuestos de esta planta en un organismo.

Cuadro 7. Propiedades descritas de *Moringa* en los diferentes estudios realizados

N°	Parte del árbol	Efecto descrito	Tipo de estudio
1	Corteza	Inmunomodulador / antiinflamatorio vascular	In vitro (monocitos humanos)
2	Hoja	Antimicrobiano bacterias multiresistentes	Cultivo (Gram -)

3	Hoja	Antioxidante directo e indirecto	In vitro (hepatocitos ratón)
4	Hoja	Antioxidante en esteatosis hepática	In vivo (ratón)
5	Hoja	Antiséptico de manos (E. Coli)	In vivo (humanos)
6	Hoja	Control de la diabetes mellitus tipo 2	In vivo (humanos)
7	Hoja	Disminuye la fatiga muscular	In vivo (ratas)
8	Hoja	Protector en intoxicación por arsénico	In vivo (ratón)
9	Hoja, semilla, tallo, vaina y flores	Antimicrobiano (Vibrio spp. Y E. coli)	En agua contaminada
10	Hojas	Antiinflamatorio vascular	In vitro (macrófagos ratón)
11	Semilla	Antimicrobiano (E. Coli y B. subtilis)	En agua contaminada
12	Semilla	Antimicrobiano en biofilms	Biofilms
13	Semilla	Antioxidante hepático en dietas grasas	In vivo (ratón) e in vitro (hepatocitos ratón)
14	Semilla	Control de la diabetes mellitus tipo 1	In vivo (rata)
15	Semilla y vaina	Antimicrobiano bacterias multiresistentes	Cultivo (Gram + y Gram -)

Fuente: Doménech Asensi et al. (2017)

2.1.3.8. Usos de la Moringa oleífera

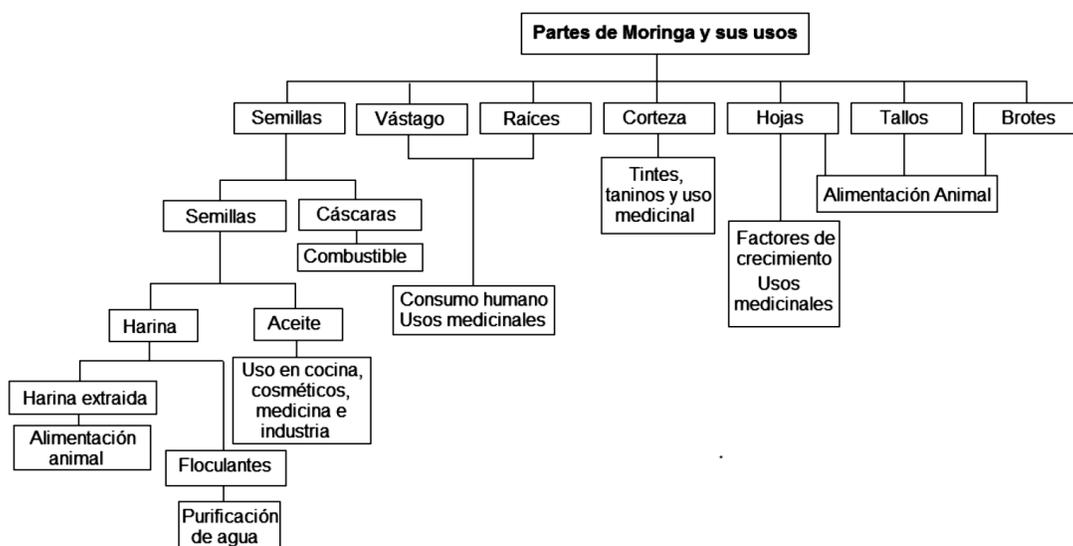
2.1.3.8.1. Usos industriales

Esta planta es utilizada para diversas actividades, respecto a la industria autores como Folkard & Sutherland (2000); Madrigal & Avalos (2012), reportan en sus publicaciones los siguientes usos:

- Las hojas son utilizadas para la generación de biogás y las hojas trituradas como agente de limpieza.
- De la corteza se extrae fibras para la elaboración de cuerdas, esteras y felpudos, además, es usado como taninos en el curtido de pieles.
- La madera se extirpa un tinte azulado de uso industrial.
- El tallo es usado como postes vivos para diferentes elementos de cerramiento como alambres, vallas y otros.

- La leña es usada como un combustible aceptable para la cocina, presenta una densidad media de 0,6 y poder calorífico de 4600 kcal/kg.
- Coagulante natural para el tratamiento con semilla, el consumo de agua de ríos en poblaciones del trópico, presenta turbiedad (principalmente en época lluviosa) que deben sufrir un proceso de purificación con la utilización de coagulante.
- Se ha investigado el potencial de la semilla triturada de Moringa Oleífera, como alternativa viable para reemplazar al coagulante químico Sulfato de Aluminio (alumbre). El proceso es simple, las vainas se hacen secar en el árbol, la semilla se desvaina y se tritura, posteriormente se debe tamizar, como si fuera harina.
- El polvo de la semilla al mezclarse con el agua produce proteínas solubles con carga neta positiva en dosis de entre (1-3%) actúa como polielectrolito canónico.

En la figura 10, se presenta un resumen de los usos que se le da a la planta de Moringa.



Fuente: Foidl et al, citado por Canett-Romero et al. (2014)

Figura 10. Usos potenciales de la moringa

2.1.3.8.2. Usos medicinales

Además de los usos industriales la planta de la moringa también es usado para la medicina, Gómez Gómez (2013) reporta los siguientes usos más sobresalientes:

- ❖ Se usa de forma medicinal toda la planta como remedio para ascitis, asma, catarro, cólera, convulsiones, disentería, dolor de oído, dolor dental, entre otros.

- ❖ Los frutos son considerados afrodisiacos, asimismo se utiliza en el trastorno de hígado, la infusión de sus semillas es purgante y febrífuga.
- ❖ La raíz es usada para combatir la fiebre, parálisis, reumatismo, además de laxante, diurético, la corteza fresca es un antídoto contra la picadura de insectos,
- ❖ La corteza se comenta que es un estimulante, diurético y antiescorbútica, su jugo se toma contra el asma, reumatismo y otros.
- ❖ Las flores, hojas y raíces tienen una propiedad abortiva, bactericida, diurética y purgante.
- ❖ Mientras las hojas se usan para curar enfermedades leves, algunos estudios clínicos sugieren que algunas de estas ideas son válidas. Como su uso para infecciones de la piel, llagas, espinillas, y dolores internos como bronquitis, congestión del pecho, cólera, diarrea, trastornos respiratorios, tuberculosis y otros.

Diversos países ya reportaron los usos realizados en la medicina con la planta de moringa, en el cuadro 8 se presenta los usos dados a las hojas por países.

Cuadro 8. Usos en los países de las hojas de Moringa

País/ región	Malestares
Malasia	
Puerto rico	• Contra gusanos intestinales
Venezuela	

Nicaragua	<ul style="list-style-type: none">• Dolor de cabeza• Infecciones de la piel (llagas)
Filipinas	<ul style="list-style-type: none">• Contra anemia
Senegal	<ul style="list-style-type: none">• Diabetes• Infecciones de piel (llagas)
Guatemala	<ul style="list-style-type: none">• Infecciones cutáneas y urticaria
China	<ul style="list-style-type: none">• Diurético
	<ul style="list-style-type: none">• Anemia• Ansiedad• Cólera• Diarrea• Dolor de articulaciones
India	<ul style="list-style-type: none">• Infertilidad• Tuberculosis• Irritación de garganta• Inflamación• Aborto• Fiebre• Congestión en el pecho

Fuente: Canett-Romero et al. 2014; Gómez Gómez 2013

2.1.3.9. Toxicidad de las hojas

Las hojas de Moringa no contienen taninos, pero si presencia de fitatos que puede ser dañino para los vegetarianos por el bajo consumo de Zinc y Magnesio (Perelló, citado por Canett-Romero *et al.*, 2014).

Las hojas de esta planta representan bajo riesgo a la salud, según Asare una dosis de 2000mg/Kg en ratas no existe mortalidad, pero a 3000mg/Kg se observó una disminución de los niveles de albúmina. Algunos estudios del extracto acuoso inducen un aumento en el conteo de glóbulos blancos, principalmente en células fagocíticas. Esto explica de cierta forma su capacidad para combatir infecciones, pero también puede relacionarse a la hipertrofia de bazo y timo; la planta puede contener sustancias implicadas en la activación o amplificación de la respuesta inmune, o ser un efecto secundario del aumento del conteo de células fagocíticas debido a los procesos de activación en bazo y de proliferación en timo (Canett-Romero *et al.*, 2014).

2.2. Metabolitos

Los metabolitos son los productos intermedios o finales del metabolismo en una planta, se clasifican en metabolitos primarios y metabolitos secundarios.

2.2.1. Metabolitos primarios

Ávalos García & Pérez-Urria (2009), menciona que el metabolismo es un conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras sustancias más simples, o para degradar las complejas y convertirlas a simples. Dentro de un organismo están en mayor parte carbono, nitrógeno y energía que terminan en moléculas comunes a todas las células que son necesarias para el funcionamiento y el de los organismos.

Los metabolitos primarios son aquellos que están directamente relacionados en el crecimiento normal, el desarrollo y la reproducción de la planta. Se caracterizan por tener una función metabólica directa, entre estos tenemos (Salamanca Maqueda, 2012):

- Ácidos grasos
- Carbohidratos
- Lípidos
- Proteínas

Estos están presentes en todas las plantas y desempeñan las mismas funciones y se denominan “metabolito primario” (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

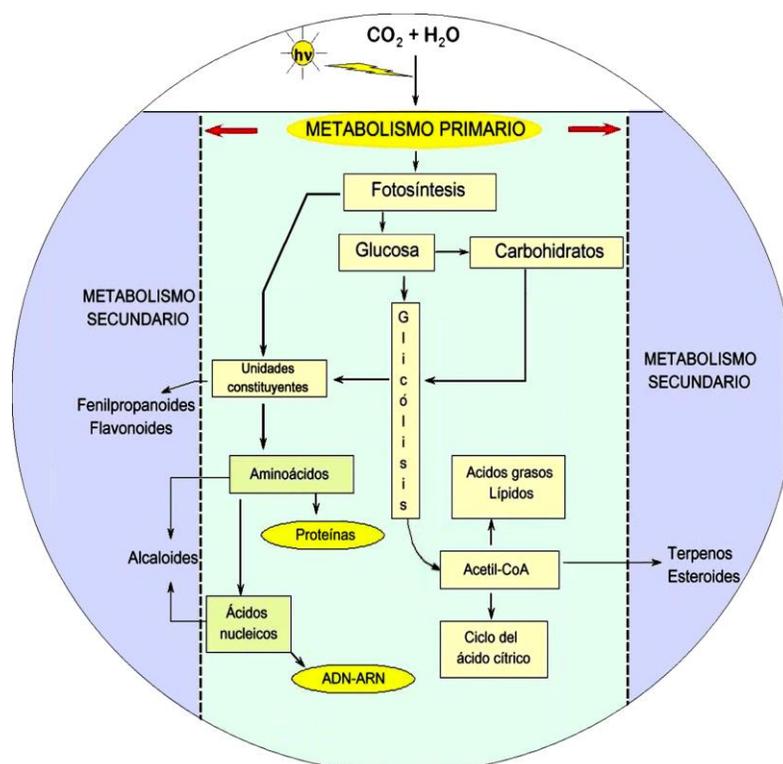
2.2.2. Metabolitos secundarios

Según Valdés y Baldin citados por Lezcano *et al.* (2012), el metabolismo secundario es la biosíntesis, la transformación y la degradación de compuestos endógenos propios de las especies vegetales, los cuales bajo determinadas circunstancias, pueden causar efectos diversos.

Las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y de energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, denominado “metabolito

secundario”, “productos secundarios” o “productos naturales” (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todas las plantas, se sintetizan en pequeñas cantidades a partir del metabolismo primario, sin embargo, a pesar de una producción baja, algunos productos tienen funciones ecológicas específicas como intervención o en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente para la protección de los depredadores herbívoros, virus, hongos y bacterias (Rojas A. *et al.*, 2015).



Fuente: Ávalos García & Pérez-Urria (2009)

Figura 11. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas

Además, da a la planta un sabor amargo, otros proporcionan su pigmento a las flores y frutos, y finalmente tienen un valor medicinal, económico, cosmética, alimentaria y farmacéutica (Robles García *et al.*, 2016). Los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres clases principales:

- Terpenos o Terpenoides
- Alcaloides
- Compuestos fenólicos

2.2.2.1. Terpenos o terpenoides

Ávalos García & Pérez-Urria, (2009), menciona que los terpenos son el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más 40000 moléculas diferentes), ejemplos de metabolitos primarios como: hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y este rol importante en la estructura de membranas. Suelen ser insolubles en agua, estos derivan de las de unidades de isopreno (5C), estos se clasifican por el número de unidades: monoterpenos (10C contiene dos unidades C5), sesquiterpenos (15C tres unidades de isopreno), diterpenos (20C), los triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) y politerpenos (más de 8 unidades de isopreno) (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

Algunas plantas producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides llamada “aceites esenciales”, estos son responsable de olores y sabores característicos de las plantas, son generalmente monoterpenos (Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

2.2.2.2. Alcaloides

Están compuestos con más de 15000 metabolitos secundarios, son solubles en agua, tiene al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica, la mayoría son heterocíclicos y la menor parte son nitrogenados alifáticos (mescalina, colchicina) (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009). Las plantas los producen mediante un proceso metabólico y constituyen sustancias de reserva capaces de proveer nitrógeno (Rojas A. *et al.*, 2015). Se clasifican en:

- Alcaloides derivados de la ornitina y la lisina.
- Alcaloides derivados de la tirosina y la fenilalanina.
- Alcaloides derivados del triptófano.
- Alcaloides derivados del ácido nicotínico.
- Alcaloides derivados de la histidina.

2.2.2.3. Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo

hidroxilo, en la figura 12 se observa la estructura química del compuesto aromático base (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

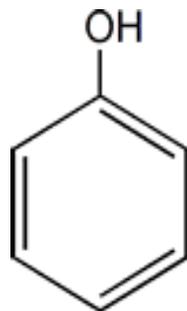
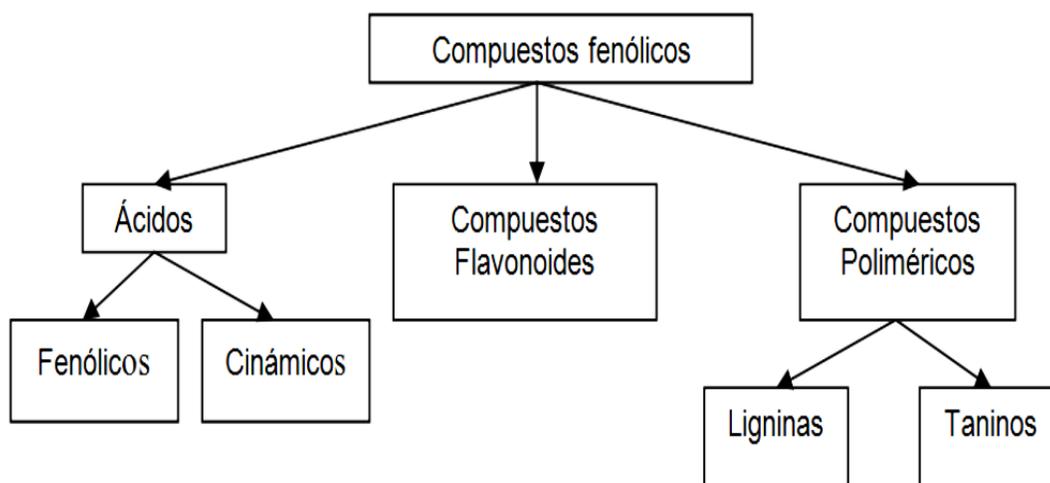


Figura 12. Estructura química del fenol

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: ruta del ácido siquímico y ruta del ácido malónico (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

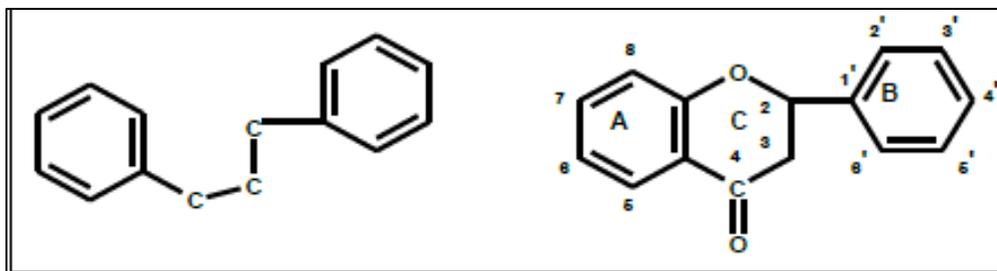


Fuente: Langseth citado por Gastón Federico (2016)

Figura 13. Esquema de clasificación de compuestos fenólicos

2.2.2.3.1. Flavonoides

Son compuestos polifenólicos, que contribuyen a dar el color a los frutos, flores y hojas. (Delporte *et al.*, 2014), caracterizado por quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos bencénicos, unidos por un puente de tres átomos de carbono, de estructura general $C_6 - C_3 - C_6$ (Cartaya y Reynaldo citados por Ávalos García & Pérez-Urria, 2009), del mismo modo presentan al menos tres hidroxilos fenólicos y generalmente se combinan con azúcar en forma de glucósidos, aunque también se presentan como agliconas libres.



Fuente: Delporte et al. (2014)

Figura 14. Secuencia de flavonoides $C_6 - C_3 - C_6$

Son los compuestos fenólicos más numerosos y están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cascaras de frutas. Estos compuestos juegan un papel importante como metabolitos secundarios (Crozier *et al.* citados por Vélez-Terranova *et al.*, 2014)

A. Características de los flavonoides

Son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco amarillento, sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares, siendo así insolubles en los apolares, pero en estado libre son poco solubles en agua, pero aun solubles en disolventes orgánicos oxigenados; son sustancias fácilmente oxidables, por tanto, tienen efecto antioxidante por la rapidez de oxidación respecto a otras sustancias (López, 2002).

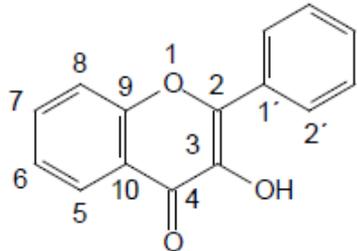
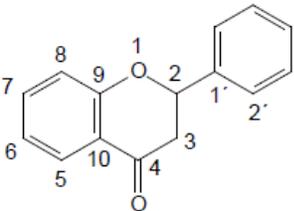
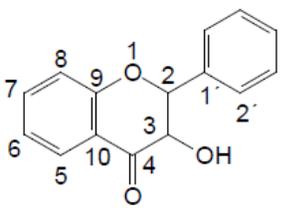
Las funciones de los flavonoides en plantas según Neira (2009), menciona las siguientes:

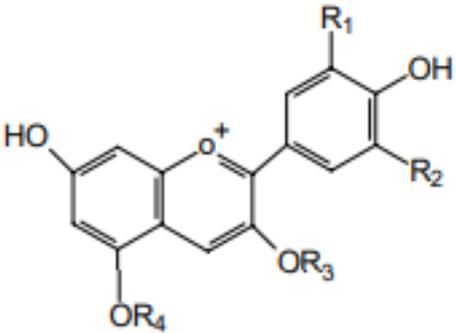
- Capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta que los convierte en filtros solares (protege los tejidos vegetales).
- Diferentes actividades biológicas.
- Variados colores y presencia en las flores, para la polinización.
- La capacidad inhibidora de hormonas vegetales, reguladores del crecimiento vegetal.

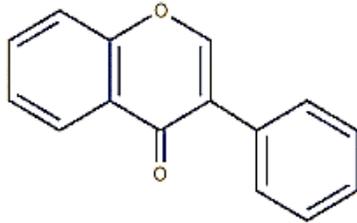
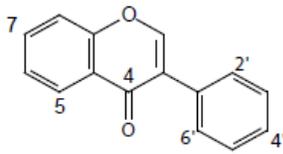
B. Tipos de flavonoides

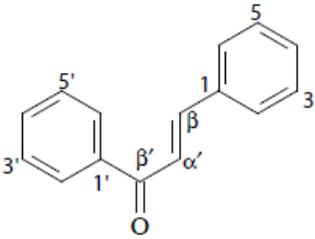
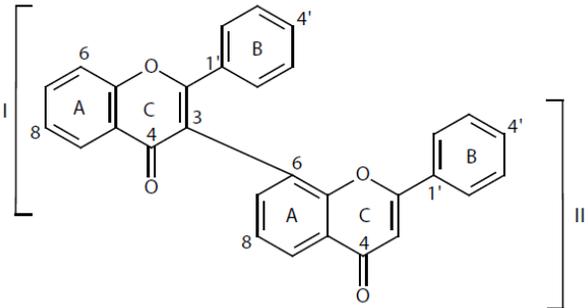
Los flavonoides se clasifican por la variación estructural, la sustitución del anillo C, que se detalla en el cuadro 9 de la siguiente forma:

Cuadro 9. Clasificación de los flavonoides por variación estructural

Nombre	Características	Estructura		Referencia
Flavonas y flavonoides	<p>Son estructuras básicas compuestas por derivados de la benzo-gama-pirona, poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.</p> <p>Posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en posición C3 que puede estar metilado o glicosilado de este grupo</p>	 <p>Flavonoles</p>		(Cuesta <i>et al.</i> , 2015; Martínez-Flórez <i>et al.</i> , 2002; Rojas <i>et al.</i> , 2015)
Flavanonas y flavanonoles	<p>Las flavanonas poseen un esqueleto base del tipo 2-fenil cromanona, en esta el C2 es un centro asimétrico y por lo tanto hay dos posibilidades enantiómeros</p> <p>Están en pequeñas cantidades, por su baja concentración y la característica incolora, han sido poco estudiados.</p>	 <p>Flavanonas</p>	 <p>Flavanonoles</p>	(Cuesta <i>et al.</i> , 2015; Rojas A. <i>et al.</i> , 2015)

Nombre	Características	Estructura	Referencia
	Los flavonoles corresponden con las 3-hidroxi-flavanonas, la sustitución del C3 por un grupo OH produce un desblindaje.		
Antocianos	Se encuentran como glucósidos, después de la clorofila, son el grupo más importante de los pigmentos en las plantas, son visibles al ojo humano y proporcionan los colores: malva (gama de violeta), rosa, violeta y azulado en varias flores y frutos, puede llegar a ocupar hasta 30% de masa. Tiene unido el grupo OH en la posición 3 además de poseer un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Por ejemplo: cianidina, delphinidina, elargonidina y peonidina.		(Rojas A. <i>et al.</i> , 2015; Vélez-Terranova <i>et al.</i> , 2014)

Nombre	Características	Estructura	Referencia
Isoflavonoides	<p>Caracterizado por tener el anillo B en la posición 3, a diferencia de los flavonoides que los ubican en la posición 2.</p> <p>También algunos son considerados fitoestrógenos, pues demostraron tener un efecto estrogénico débil.</p>		(T. López, 2002; Rojas <i>et al.</i> , 2015)
isoflavonas	<p>Son coloreadas y están menos distribuidas en las plantas, casi restringidas en las leguminosas, pero se destacan por ser como fitoalexinas. Está constituido por un metino oxiolefinico, un carbono cuaternario olefinico y un carbono carbonilico.</p>	 <p>Isoflavonas (3-fenil cromonas)</p>	(Cuesta <i>et al.</i> , 2015; Rojas A. <i>et al.</i> , 2015)

Nombre	Características	Estructura	Referencia
Chalconas y dihidrochalconas	<p>Son pocas, pues se convierten en flavanonas en medio ácido (reacción vista en in vitro) por ser estas más coloreadas que las flavanonas (en medio básico coloración anaranjadas-rojizas)</p> <p>Las chalconas se caracterizan por la ausencia del anillo C común en los flavonoides y la presencia de un enlace doble trans que se reconoce fácilmente desde el espectro RMN1H.</p>	 <p>Chalconas (1,3-diarilprop-2 en-1-ona)</p>	(Cuesta <i>et al.</i> , 2015; Rojas A. <i>et al.</i> , 2015)
Biflavonoides	<p>Son dímeros de flavonoides, pocas veces encontrados como glucósidos, aparecen predominantemente en gimnospermas (Martínez <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>La mayoría de los biflavonoides naturales contienen monómeros enlazados a través de enlaces C-C.</p>	 <p>Biflavonoides</p>	(Cuesta <i>et al.</i> , 2015; Rojas A. <i>et al.</i> , 2015)

Fuente: *Cuesta et al. (2015); López (2002); Martínez-Flórez et al. (2002); Rojas A. et al. (2015); Vélez-Terranova et al., (2014)*

C. Uso de los flavonoides en la actividad farmacológica

Los flavonoides han sido empleados de diferentes formas, Lock *et al.* (2006) mencionan las siguientes:

- Antiguamente como colorantes de lana.
- Protección contra insectos, hongos, virus y bacterias.
- Atrayentes de animales con finalidad de polinización.
- Antioxidantes.
- Control de la acción de las hormonas vegetales.
- Agentes alelopáticas.
- Inhibidora de las enzimas.

Los flavonoides se hallan presentes en todas las partes de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles y más restringidos las isoflavonas, las chalconas y auronas (Lock *et al.*, 2006).

Cuadro 10. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides

Efectos	Flavonoides
Antineoplásico	Quercetina, kaemferol, fisetina
Cardiotónicos	3-metil-quercetina
Disminuyen la fragilidad capilar	Rutina, quercetina, naringenina
Antitrombóticas	Tangeretina, hesperidina, rutina
Disminución de colesterol	Liquiritigenina
Protección y regeneración hepática	Silimarina, apigenina
Antiulcéricos	Kaemferol, quercetina
Antimicrobianos	Quercetina, baicalina
Antibacterial	Crisina, rutina
Antiviral	Crisoeriol
Antifúngica	Cloroflavonina, apigenina
Antiinflamatorio	Hesperidina, luteolina, quercetina
Analgésico	Hesperidina
Anticancerígeno	Quercetina

Fuente: Estrada Reyes et al. (2012)

Se destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de resistencia de los capilares) así lo menciona López (2002). En áreas como la farmacología los flavonoides tienen diversos efectos, que se presentan en el cuadro 10 (Estrada Reyes *et al.*, 2012).

Lock *et al.*, (2006) menciona que se tienen efectos antioxidantes, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libre y quelar metales, impidiendo los catalizadores de los radicales libres. También ejercen acción diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria.

2.3. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es también llamado “*screening*”, es una técnica preliminar para la detección de metabolitos secundarios presentes en una muestra, se define como un análisis cualitativo basado en reacciones químicas a partir de reactivos específicos por el cambio de coloración o formación de precipitación, que da indicativo positivo de presencia de metabolitos secundarios. Estos resultados son una herramienta orientadora y de preferencia, que deben interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico (Cuesta *et al.*, 2015).

Es un método rápido, simple con el mínimo de equipamiento, pero no brinda información cuantitativa, ni define la presencia o ausencia de miembros específicos del grupo que se evalúa, no tiene alta sensibilidad por eso los resultados negativos no deben tomarse como definitivos, uno de los factores que afectan es la alta pigmentación de los extractos a partir de hojas, presencia de clorofila, el verde intenso podría enmascarar los cambios de coloración sobre todo las tonalidades similares al verde, por eso esta técnica solo ofrece una visión general de la composición de la planta (Cuesta *et al.*, 2015; Olvera *et al.*, 2017).

2.3.1. Reacciones de identificación de compuestos fenólicos

Existen diversos ensayos para la identificación de compuestos fenólicos (flavonoides), a continuación, se describen:

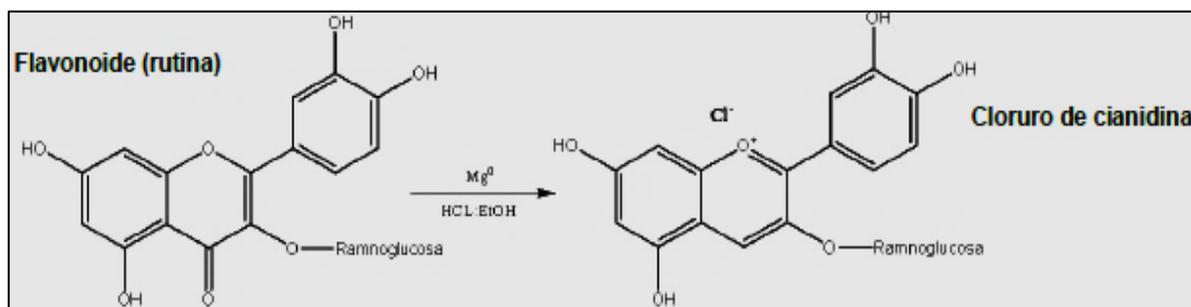
2.3.1.1. Ensayo de cloruro férrico

Reconoce la presencia de compuestos fenólicos en un extracto vegetal, si el análisis se realiza en un extracto etanólico, el ensayo determina tanto fenoles como taninos, mientras en extracto acuoso solo determina taninos, se interpreta como ensayo positivo en caso de (Pérez Freire, 2011):

- Coloración rojo-vino: compuestos fenólicos general.
- Coloración verde intensa: taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul: taninos del tipo pirogalactónicos.

2.3.1.2. Ensayo de Shinoda

Delporte *et al.* (2014), menciona que este ensayo permite reconocer presencia de flavonoides en extracto vegetal, también conocido como la reacción de Shivata o reacción de la Cianidina esta permite reconocer los flavonoides (Figura 15), que se fundamenta a partir del contacto del ácido clorhídrico con magnesio metálico genera hidrógeno, este último reduce al flavonoide desarrollando coloraciones que van del rojo anaranjado al violeta (para los flavonoles el color es rojo cereza) evidenciado en la fase orgánica.



Fuente: Delporte et al. (2014)

Figura 15. Reacción de Shinoda

De acuerdo a lo mencionado por Pérez Freire (2011), el ensayo se considera positivo cuando la fase orgánica (alcohol amílico) se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso. En el caso de evidencia positiva se manifiesta de la siguiente manera según la investigación de realizada por Bonilla Ríos *et al.* (2014):

- Flavonas: amarillo, naranja o rojo.
- Flavonol o flavanonol: rojo a carmesí, rojo magenta.
- Flavanonas: carmesí a magenta, rojo, magenta, violeta, azul.

- Isoflavonas: amarillo.
- Isoflavanonas, chalconas y auronas: incoloras.

2.3.1.3. Ensayo con álcalis

Los compuestos que tienen OH adyacentes tanto en el anillo A como en el anillo B se descomponen dando un color amarillo a rojo (Farmacognosia, s.f.). Bonilla Ríos *et al.* (2014), recomiendan seguir el siguiente proceso para este ensayo: extraer una alícuota de 1ml de extracto alcohólico, se basifica con *NaOH* 5% y se observa los cambios de coloración, siendo positiva cuando presenta coloración:

- Flavonas, flavanonol e isoflavonas: amarillo
- Flavanonas y flavonol: amarillo a naranja
- Chalconas: naranja o rojo

El mismo autor manifiesta que estos resultados no son exclusivos de los flavonoides, otros metabolitos secundarios pueden originar similares resultados.

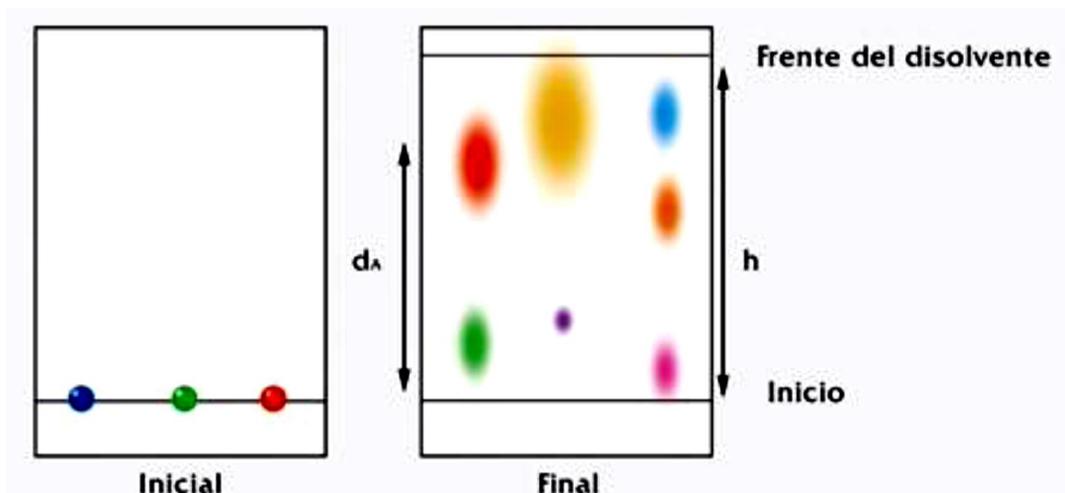
2.4. Cromatografía

Es una técnica de separación de las especies químicas (Corzo, 2019), que determina la presencia de grupos o compuestos fitoquímicos (Pérez Freire, 2011), se basa en la retención selectiva de distintos componentes de una mezcla (Corzo, 2019) y se clasifican en:

- Cromatografía en papel.
- Cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en columna.
- Cromatografía de permeación en gel.
- Cromatografía de exclusión de iones.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía de fluidos supercríticos.
- Cromatografía de afinidad.
- Cromatografía de líquidos de alta resolución.

De las cromatografías anteriores generalmente se inicia una separación previa con la cromatografía en capa fina, esta requiere de: un adsorbente (silicagel, alúmina), eluyente

(compuestos de diferente polaridad) y revelador (luz UV, vapores de yodo, ácido sulfúrico y otros), las características de estos componentes pueden variar según el grupo que se desea separar e identificar (Figura 16).



Fuente: Corzo (2019)

Figura 16. Cromatografía de capa fina.

2.5. Técnicas de análisis

2.5.1. Espectrofotometría UV-visible

Es una técnica analítica que identifica y cuantifica compuestos presentes en soluciones, se basa en la absorción de las radiaciones electromagnéticas y cantidad de luz absorbida dependiendo de la concentración, estos compuestos se presentan dependiendo de las condiciones como: pH, temperatura, fuerza iónica y otros (Díaz *et al.*, 2008).

La absorción molecular en la región UV-Visible depende de la estructura electrónica de una molécula, esta absorción da por resultado la elevación de los electrones desde orbitales en el estado básico a orbitales de mayor energía en un estado excitado, la diferencia de esta energía entre el estado básico y el estado excitado; cuanto menor es la diferencia de energía mayor la longitud de onda de la absorción. El exceso de energía en el estado excitado puede dar por resultado la ionización de la molécula o se puede volver a emitir en forma de calor o luz. El desprendimiento de energía en forma de luz da por resultado la fluorescencia o fosforescencia (Díaz *et al.*, 2008).

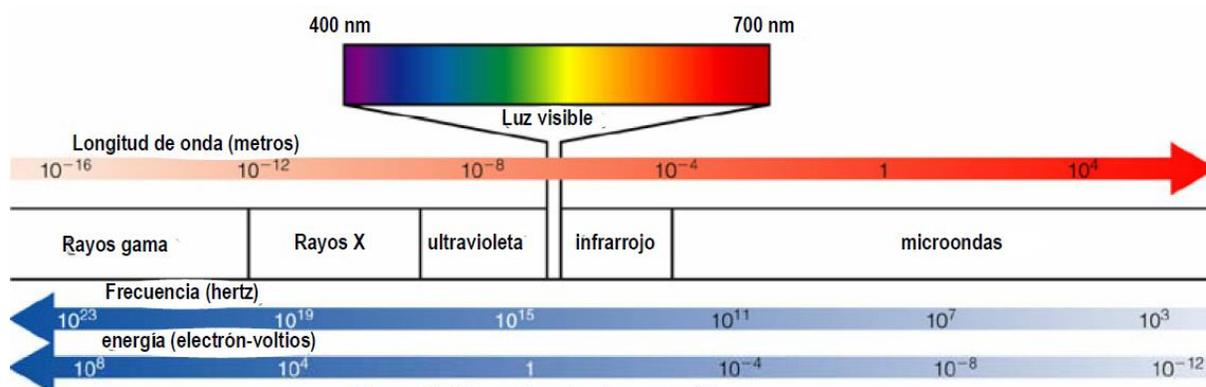


Figura 2. Espectro electromagnético

Fuente: Díaz *et al.* (2008)**Figura 17.** Espectro electromagnético

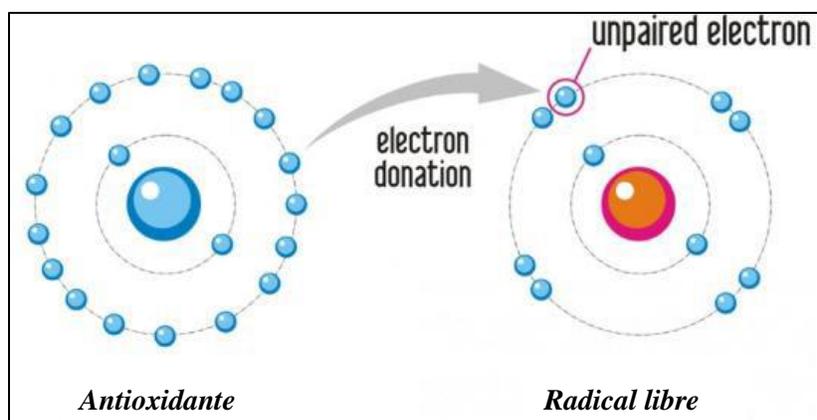
En la región visible se observa el color de la solución y corresponde esto a las longitudes de onda de luz que transmite, no se absorbe; el color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por eso para su lectura se utiliza la longitud de onda en la que se observa luz la solución coloreada. Su lámpara usualmente es de tungsteno y la energía es por debajo de 320nm (Díaz *et al.*, 2008).

Cuadro 11. Longitudes de onda según el color

Longitud de onda aprox.	Color de luz que se absorbe	Color de luz que se refleja
390 – 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 – 490	Azul	Amarillo
490 – 580	Verde	Rojo
580 – 595	Amarillo	Azul
595 – 650	Naranja	Azul verdoso
650 – 780	Rojo	Verde azulado

Fuente: Díaz *et al.* (2008)**2.6. Actividad antioxidante**

Son moléculas con un electrón desapareado que se convierten por la transferencia de energía o reacciones de transferencia de electrones, se define como la capacidad de inhibir el proceso de oxidación (Álvarez citado por Bello & Camargo, 2018).



Fuente: Bello & Camargo (2018)

Figura 18. Como los antioxidantes reducen a los radicales libres

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero si determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado, esta medición es de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante, pero esto no debe ser el único ensayo de prueba (Orjuela, 2015).

Con base a las reacciones químicas, se dividen en dos categorías.

1. Ensayo basado en la reacción por transferencia de átomos de hidrógenos (HAT).



El ensayo basado en HAT monitorea una reacción cinética competitiva, está compuesto generalmente del generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante.

2. Ensayo basado por reacción de transferencia de electrones (ET)



Este ensayo involucra una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción.

Ambos ensayos fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra.

Los ensayos antioxidantes in vitro utilizan un captador de radicales libres, el método DPPH es más rápido, simple y menor costo; mientras el ensayo de decoloración ABTS se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Orjuela, 2015).

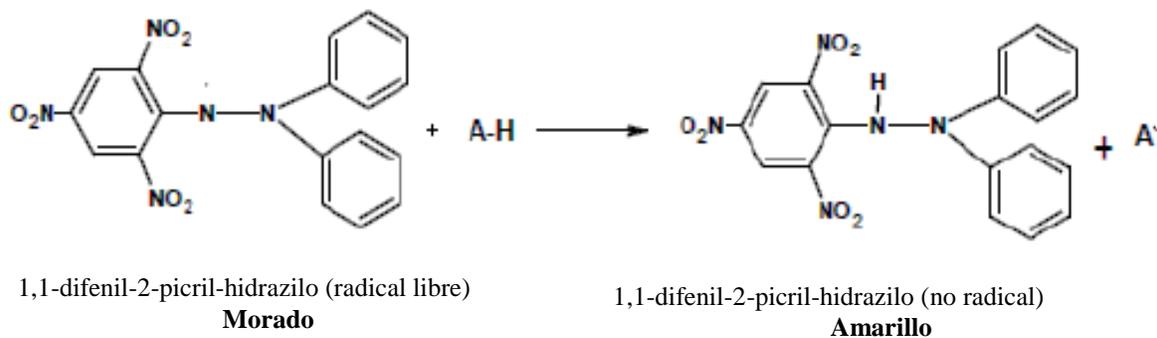
Cuadro 12. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT

Ensayo	Categoría
Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS*)	
1,1 –difeníl-2-picril-hidrazilo (DPPH*)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N, N-dimetil-fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	

Fuente: Huang et al. citado por Orjuela (2015)

2.6.1. Ensayo de decoloración del radical 1,1–difeníl-2-picril-hidrazilo (DPPH*)

La molécula 1,1 –difeníl-2-picril-hidrazilo (DPPH*) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por tanto, la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres, esta deslocalización del electrón intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517nm de longitud de onda. Cuando la solución de DPPH* reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Orjuela, 2015).



Fuente: Alam et al. citado por Orjuela (2015)

Figura 19. Estructura del DPPH* antes y después de la reacción con el antioxidante

Los resultados se expresan con el valor de la concentración máxima de la media inhibitora (IC_{50}) definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial del DPPH* al 50%, este es calculado con la gráfica de porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas IC_{50} cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH* usado (Orjuela, 2015).

Este procedimiento se realiza en solución metanólica a condiciones normales de color violeta intenso y su coloración va perdiendo intensidad a medida que el electrón se aparea con el aumento de la concentración del antioxidante y por ende de los electrones absorbidos por el DPPH (Kedare y Singh citado por Bello & Camargo, 2018). La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación:

$$\% \text{ captación DPPH} = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} * 100\%$$

2.6.2. Ensayo de decoloración con el radical catiónico Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS*+)

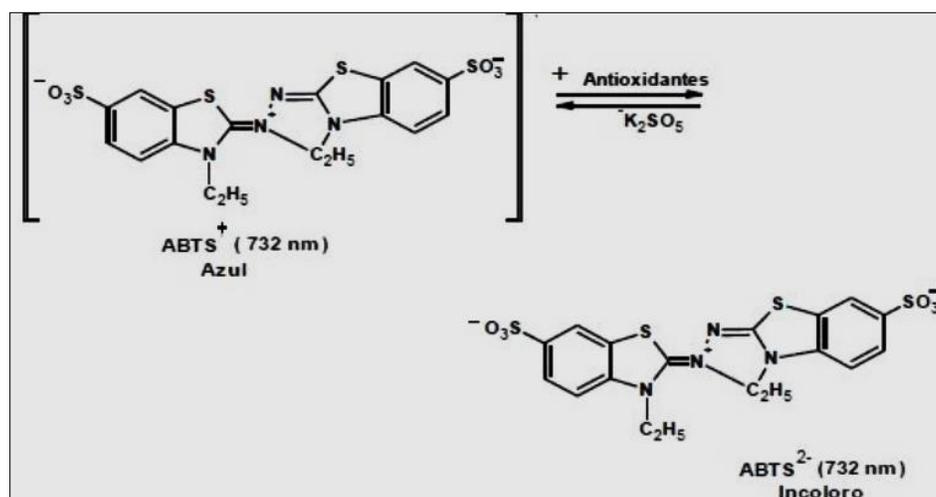
Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS*+, debido por la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS*+ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS*+ (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) con persulfato de potasio (Bello & Camargo, 2018).

Respecto a la generación del radical $ABTS^{*+}$ el mismo autor menciona que constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones. Se basa en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrogeno en presencia del ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina, es una técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes.



Se ha mejorado la técnica para la generación del radical catión $ABTS^{*+}$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^{*+}$ verde-azul por la reacción de ABTS y persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), esto presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645nm, 734nm y 815nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{*+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo, así como el valor correspondiente usando un patrón como estándar, bajo las mismas condiciones (Bello & Camargo, 2018).

El radical $ABTS^{*+}$ es indicado para los compuestos coloreados (antocianos), esto reduce las posibles interferencias de compuestos coloreados.



Fuente: Zuleta et al. citado por Orjuela (2015)

Figura 20. Estructura del $ABTS^{*+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante

La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación:

$$\% \text{ captación ABTS} * += \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} * 100\%$$

Donde:

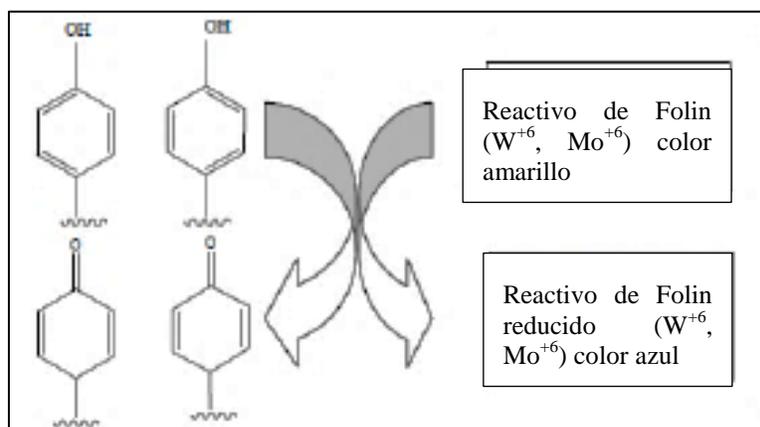
- $A_{inicial}$ = absorbancia en tiempo 0min
- A_{final} = absorbancia del antioxidante (tiempos)

El % de captación DPPH* es proporcional a la concentración de antioxidantes y la concentración que provoca una disminución en la concentración inicial de DPPH* (Orjuela, 2015).

2.7. Determinación de fenoles totales

Se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales, se basa en la reacción con el reactivo de Folin –Denis a un medio básico de pH (Figura 21), dando lugar a una coloración azul determinada por espectrofotómetro a 760nm. este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra (García *et al.*, 2012).

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio acido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de polifenoles mencionado por el mismo autor.



Fuente: García *et al.* (2012)

Figura 21. Mecanismo de acción del reactivo de Folin – Ciocalteu

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

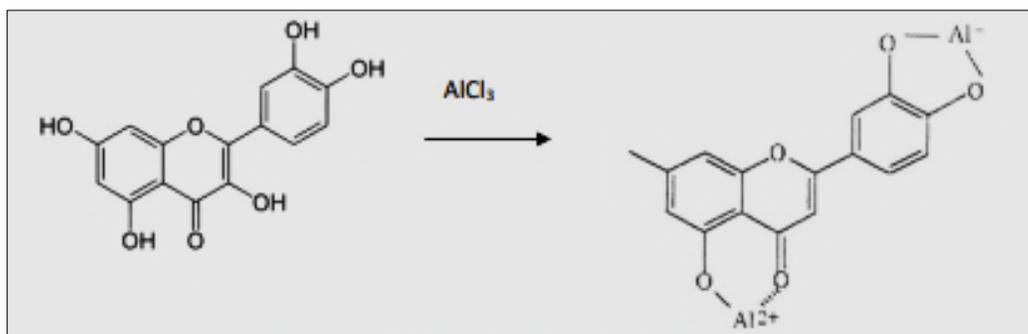
La oxidación de los polifenoles, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 760nm que es cuantificada por espectrofotometría con un patrón de ácido gálico, puede variar de acuerdo a los volúmenes utilizados, concentración de reactivos y tiempo de reacción (García *et al.*, 2012).

Se usa este ensayo que se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, esta reacción se da con el reactivo que contiene molibdato y tungsteno sódico, que en presencia de algún fenol se convierte en complejos de fosfomolibdico y fosfotungstico (Bello & Camargo, 2018). Los fenoles reaccionan mediante la transferencia de electrones a pH básico reduciendo los complejos formados en óxidos, resultando en una coloración azul intensa de tungsteno y molibdeno, este color es directamente proporcional al número de hidroxilos presentes en la molécula (Bello & Camargo, 2018).

2.8. Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides se encuentran en gran cantidad de plantas, son importantes por su efecto antiinflamatorio, antiviral y antioxidante, estos poseen grupos hidroxilos formando glicósidos, son solubles en etanol, metanol y agua.

Para la determinación de flavonoides se utiliza el cloruro de aluminio (AlCl_3), donde el catión aluminio forma complejos estables que se producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes mayores y una intensificación de la absorción, se mezcla cloruro aluminico (AlCl_3) y nitrato sodico (NaNO_2) forma un complejo flavonoide-aluminio en medio alcalino (Cartaya & Reynaldo, 2001).



Fuente: Cartaya & Reynaldo (2001)

Figura 22. Complejo flavonoide-Aluminio

2.9. Producto aplicativo

Existen diversidad de presentaciones de productos de uso farmacéutico donde se puede incorporar moléculas que benefician al ser humano, como: gel, pomada, crema, pasta o ungüento, estos tienen las ventajas por la sencilla aplicación y rápida absorción sobre la piel.

2.9.1. Gel

Se define como una sustancia semisólida, que se forman al tratar líquidos con gelificantes, que al entrar en contacto con la piel disminuye la viscosidad y pierde rápidamente el agua (López *et al.*, 2015). Son sistemas heterogéneos difásicos, donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida, pueden ser olegeles o hidrogeles en función a la naturaleza del líquido de la fase dispersa.

Cuadro 13. Ventajas y desventajas de los geles

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Son bien tolerados, por estar constituidos de agua. • Son refrescantes y ligeros. • Suelen ser transparentes. • Son fáciles de incorporarse a otras sustancias o contener ingredientes activos de forma selectiva para la piel. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se rompen en presencia de electrolitos. • Presentan problemas de estabilidad en función del pH. • Resecan la piel y para contrarrestar se debe adicionar humectantes. • Pueden presentar problemas de homogeneidad (grumos) si no se elaboran correctamente. • Tienen a incorporar burbujas de aire de difícil eliminación.

Fuente: López et al., 2015

Formulación de gel

La formulación de un gel está basado en función del pH, cuando este es bajo se disocia una pequeña proporción de grupos carboxílicos del polímero, formando una espiral flexible, al elevar el pH se produce la disociación de grupos carboxílicos, ionizándose creando repulsión electrostática generando un sistema rígido gelificándolo (FarmUpibi, 2015).

2.9.2. Control de calidad del producto terminado

Las pruebas realizadas a un producto terminado, no deben causar daño al producto, además deben ser rápidas y sencillas, como:

- pH
- Apariencia
- Untuosidad
- Pruebas organolépticas
- Masa constante

Estos son importantes para la toma de decisión del cliente al momento de adquirir el producto, pues garantizan la calidad del producto terminado.

CAPÍTULO III.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

El presente trabajo requirió diversos materiales que son listados a continuación:

3.1.1. Material vegetal

Se trabajó con las hojas de Moringa (*Moringa oleífera* Lam.) como se observa en la figura 23. Las cuales fueron adquiridas en la ciudad de El Alto, provincia Murillo del departamento de La Paz.



Fuente: Elaboración propia

Figura 23. Muestra de hojas de moringa

La recolección se realizó de manera aleatoria de distintos puestos de distribución de la ciudad de La Paz. Posteriormente se realizó el respectivo pesado tal como se puede evidenciar en la figura 24.



Fuente: Elaboración propia

Figura 24. Pesaje de las muestras de moringa

3.1.2. Material de laboratorio

Para el trabajo realizado en laboratorio se utilizaron los siguientes equipos, materiales y reactivos:

A. Equipos

- Equipo de destilación fraccionada.
- Equipo de rotaevaporador (*DLAB RE100-Pro*).
- Espectrofotómetro UV/VIS (*T8DCS UV/VIS Spectrometer*)
- Balanza analítica capacidad max. 210g (*AG-204 METTLER TOLEDO*).
- pH-metro digital.

B. Materiales

- Frascos de vidrio
- Frascos color ámbar
- Vasos de precipitado
- Varilla de vidrio
- Pipeta graduada
- Propipeta
- Micropipeta
- Embudo analítico
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz aforado
- Probeta graduada
- Tubos capilares
- Columna cromatográfica
- Gotero
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Embudo Buchner
- Bomba al vacío

C. Reactivos

a. Inorgánico

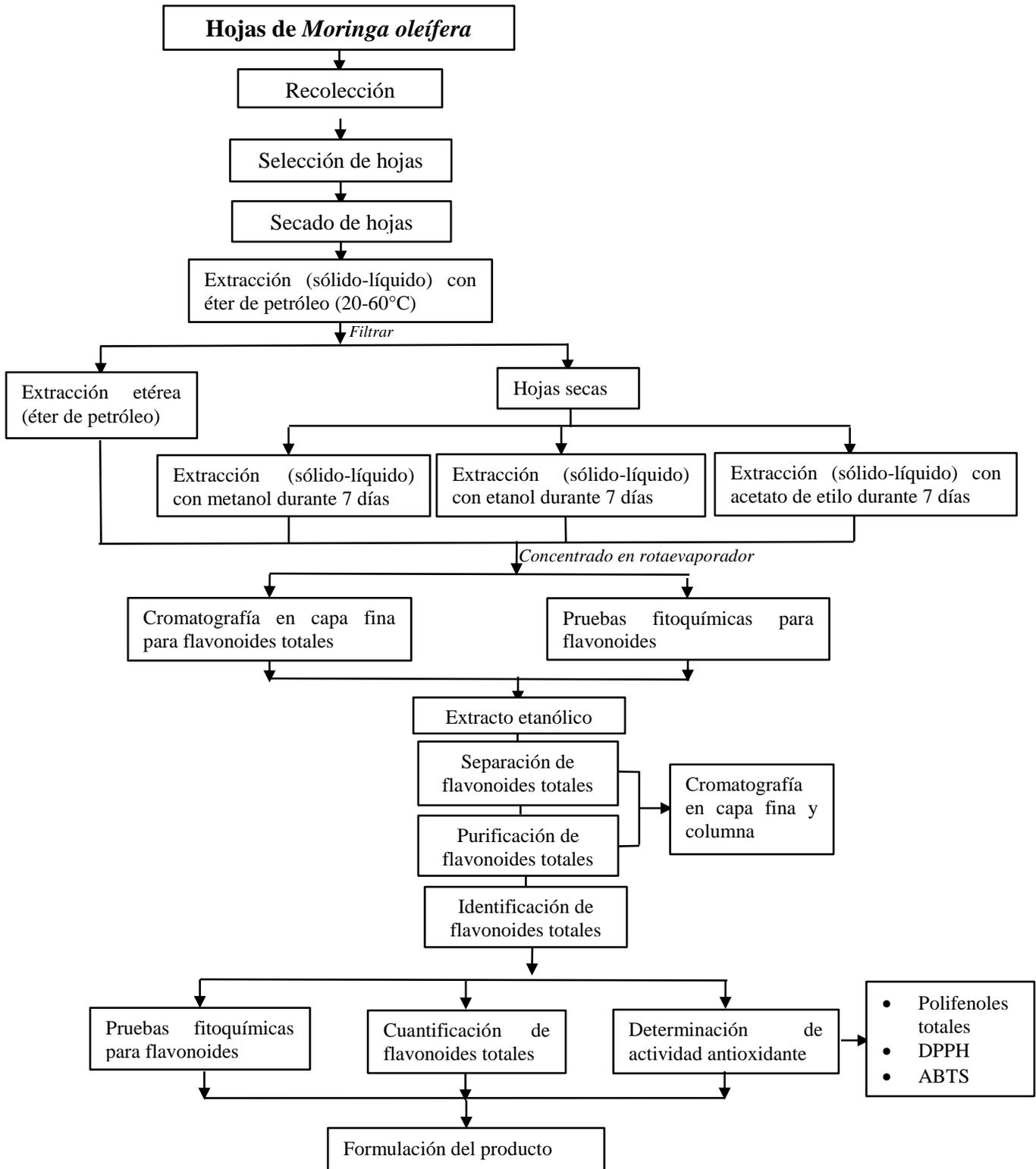
- Agua desionizada
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Magnesio (Mg)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Cloruro férrico (FeCl_3)
- Cloruro aluminico (AlCl_3)
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
- Nitrito de sodio (NaNO_2)

b. Orgánico

- Éter de petróleo (20°C - 60°C)
- Ácido acético
- Etanol 96°GL
- Acetato de etilo
- Metanol
- Patrón de quercetina
- Patrón de Pirogalol
- Reactivo de Folin-Denis
- Reactivo de DPPH (1,1-fenil-2-picrilhidrazilo)
- Ácido ascórbico
- Reactivo de ABTS (Acido 2,2- Azino- bis-3- etilbenzotiazolin- 6- sulfónico)

3.2. Metodología

El trabajo fue desarrollado bajo el siguiente diagrama (Figura 25):



Fuente: Elaboración propia

Figura 25. Diagrama del procedimiento seguido

3.2.1. Tratamiento de la muestra

Se realizó la selección de la muestra, inicialmente se separó solo las hojas de Moringa, descartando impurezas y tallos gruesos. A continuación, se extendieron las muestras en papel sábana para el respectivo secado sin luz solar. Las hojas secadas fueron reducidas de tamaño de manera manual, para posteriormente ser almacenadas en recipientes de vidrio con tapa.

3.2.2. Obtención de extractos

3.2.2.1. Extracción no polar

Para el inicio de la extracción se utilizó un solvente no polar (Éter de Petróleo 20°C a 60°C), el cual fue obtenido a partir de la destilación fraccionada desde la gasolina, proceso que se muestra en la figura 26.



Fuente: Elaboración propia

Figura 26. Destilación fraccionada del éter de petróleo a partir de gasolina

Se utilizó éter de petróleo con el propósito de extraer las sustancias no polares de las hojas de moringa como grasas, terpenos y otros compuestos.

Como se conoce que la extracción sólido-líquido es una operación unitaria, en este proceso se obtuvo uno o varios componentes solubles de un sólido mediante el disolvente apropiado. Para esto se pesó 500g de hojas de Moringa seca, puestos en un recipiente de

vidrio, se agregó éter de petróleo (20°C a 60°C) hasta cubrir toda la masa de la muestra, como se observa en la figura 27. Posteriormente el recipiente fue cerrado verificando que no exista algún tipo de fuga, seguidamente fue almacenado en un espacio libre de la luz solar durante tres días con agitación frecuente.



Fuente: Elaboración propia

Figura 27. Extracción no polar

Pasado el tiempo de extracción con éter de petróleo, se procedió a realizar la separación con papel filtro estándar, el filtrado se llevó al rotaevaporador donde se obtuvo un extracto libre de solvente, este proceso se llevó a cabo en volúmenes reducidos y proporcionados (Figura 28).



Fuente: Elaboración propia

Figura 28. Concentración del extracto en el rotaevaporador

El extracto etéreo sin solvente se caracterizó por un color verde, que fue depositado en un frasco ámbar libre de la luz solar. Las hojas fueron puestas en papel sabana para la evaporación del solvente sobrante en un espacio libre de luz solar aproximadamente por un lapso de 2 horas (Figura 29).



Fuente: Elaboración propia

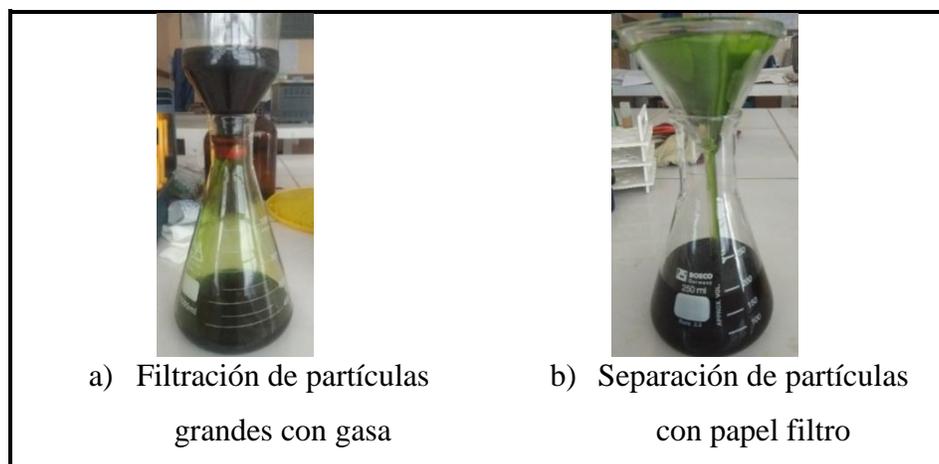
Figura 29. Evaporación del solvente de la muestra vegetal

3.2.2.2. Extracción por solventes

Se realizó por la extracción sólido-líquido con solventes de distinta polaridad como metanol, etanol 96°GL y acetato de etilo, para esto se pesó las hojas libre del solvente anterior dividiendo en tres partes, se puso en tres frascos de vidrio la masa de hojas en recipientes de vidrio, posteriormente se adicionó cada solvente en una relación 1:3 masa:volumen aproximadamente, el tiempo de extracción fue de 7 días con agitación y protección de la luz solar.

Pasado el tiempo se realizó la separación a través de la filtración simple de cada solvente, dividido en dos etapas (Figura 30):

- a) Separación de hojas (partículas grandes) con gasa.
- b) Decantación de las partículas pequeñas para posteriormente ser filtradas con la ayuda del papel filtro estándar en un matraz Erlenmeyer.



Fuente: Elaboración propia

Figura 30. Filtración de los extractos

El filtrado de cada solvente se guardó en frascos ámbar para la protección de la luz solar, luego se concentró en el rotaevaporador en volúmenes reducidos proceso mostrado en la figura 31.



Fuente: Elaboración propia

Figura 31. Proceso de concentración de extractos

Se guardó cada extracto a una temperatura baja y protegida de la luz solar durante 10 días. Se realizó el respectivo cálculo del rendimiento de todos los extractos concentrados, aplicando las siguientes fórmulas:

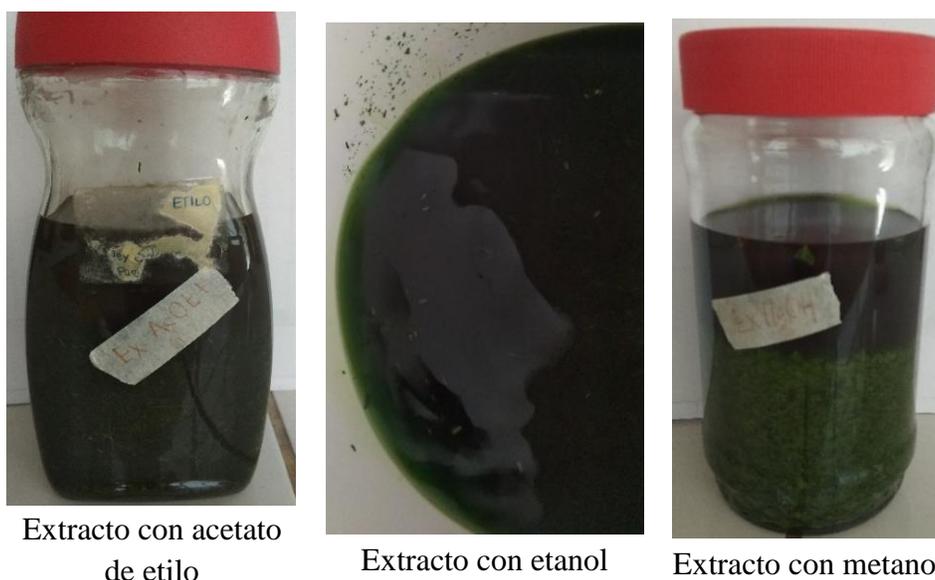
$$\% \text{Rendimiento}_{\text{ext. metanólico}} = \frac{\text{masa}_{\text{extracto metanólico}}}{\text{masa}_{\text{hoja seca inicial}}} * 100\%$$

$$\% \text{Rendimiento}_{\text{ext. etanólico}} = \frac{\text{masa}_{\text{extracto etanólico}}}{\text{masa}_{\text{hoja seca inicial}}} * 100\%$$

$$\% \text{Rendimiento}_{\text{ext. acetato de etilo}} = \frac{\text{masa}_{\text{extracto ac.de etilo}}}{\text{masa}_{\text{hoja seca inicial}}} * 100\%$$

3.2.2.2.1. Comparación de extractos

Con los 3 extractos concentrados se realizó la cromatografía en capa fina con fase móvil *Acetato de etilo: Metanol: Ácido acético: Agua (17,6:1:1:1)* donde se observa los compuestos separados (Figura 32), utilizando como revelador una solución de H₂SO₄ 30% (P/P).



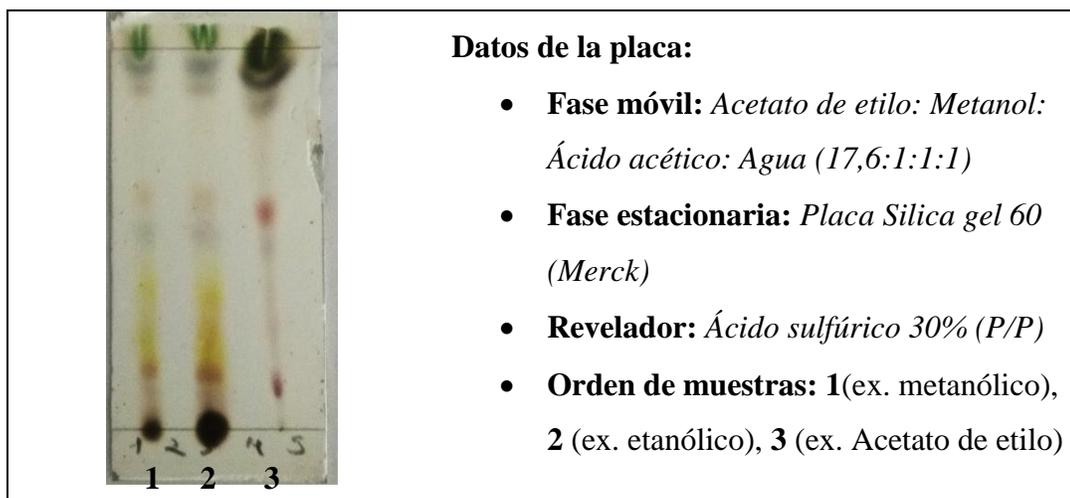
Extracto con acetato de etilo

Extracto con etanol

Extracto con metanol

Fuente: Elaboración propia

Figura 32. Muestras de los extractos con diferentes solventes

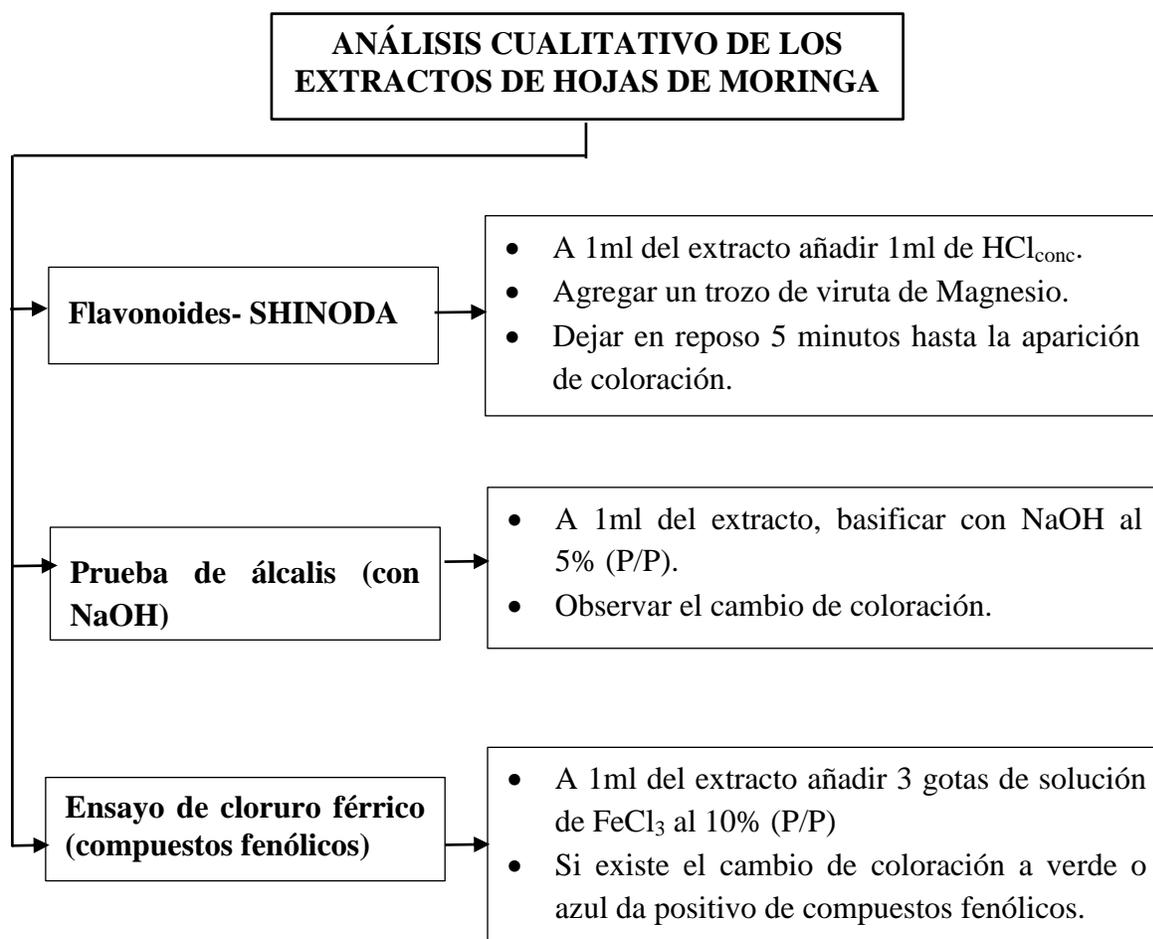


Fuente: Elaboración propia

Figura 33. Cromatografía de los diferentes extractos

3.2.2.2. Análisis fitoquímico (flujograma)

El análisis fitoquímico se realizó a cada extracto rico en compuestos fenólicos, con diferentes ensayos para identificar los flavonoides (Figura 35), basados en el diagrama presentado en la figura 34:

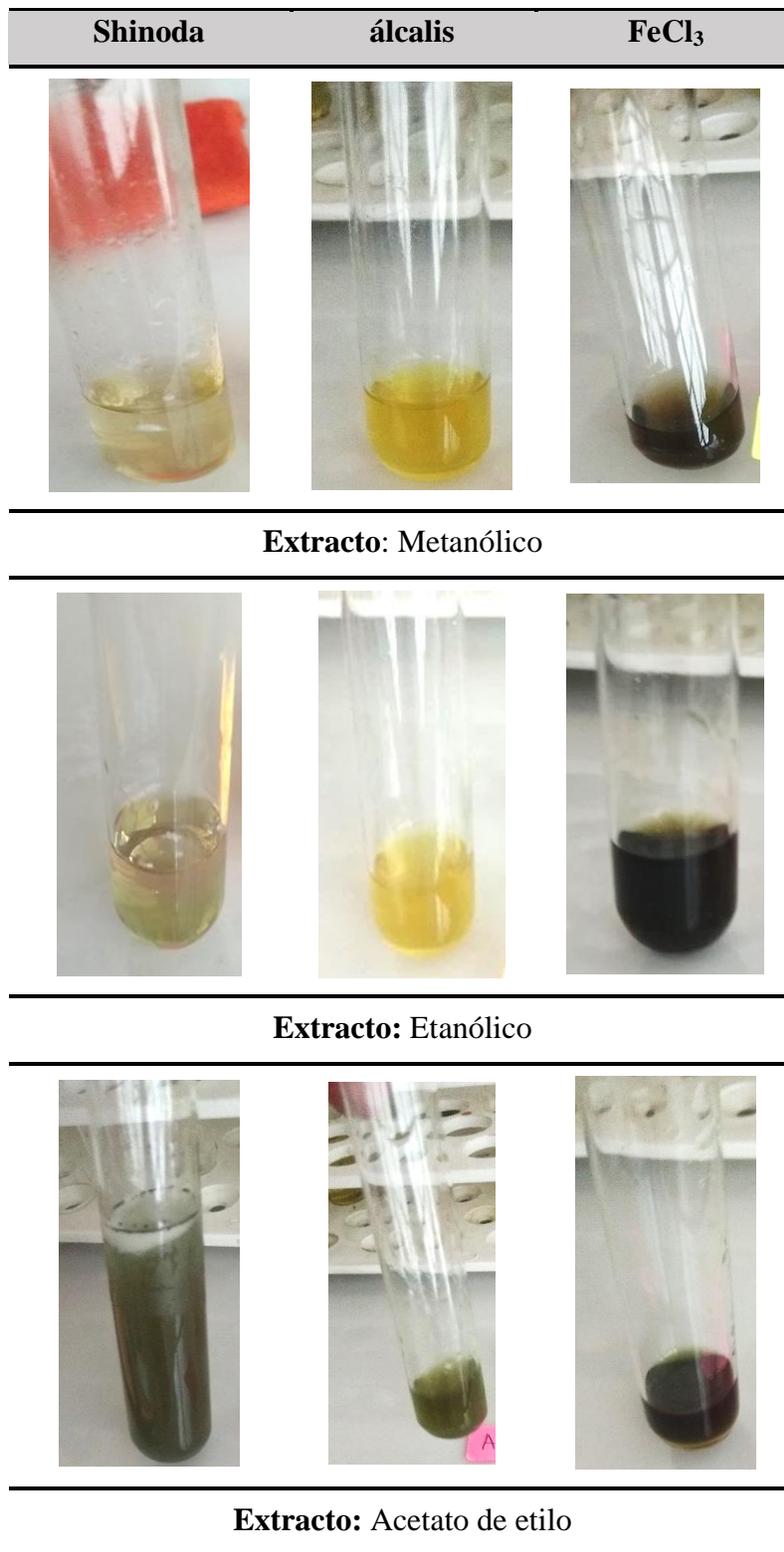


Fuente: Elaboración propia

Figura 34. Diagrama de análisis fitoquímico

Se realizaron las pruebas correspondientes a los diferentes solventes en volúmenes reducidos como como observa en la figura 35:

Prueba de	Prueba de	Prueba con
-----------	-----------	------------



Fuente: Elaboración propia

Figura 35. Pruebas fitoquímicas de los diferentes extractos

A partir de las pruebas fitoquímicas y cromatografía en capa fina presentadas se eligió el extracto etanólico por presentar mayor cantidad de componentes (flavonoides).

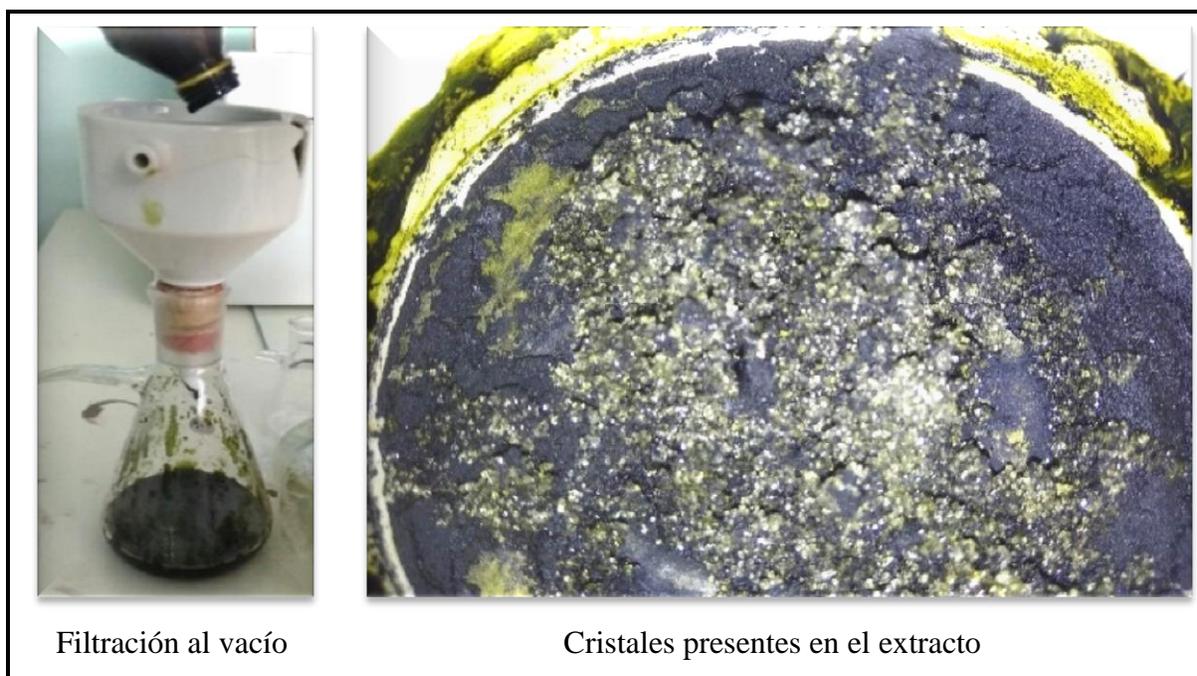
3.2.3. Separación de flavonoides totales

3.2.3.1. Separación de compuestos del extracto etanólico

Dentro de la separación de compuestos mayoritarios se inició con el aislamiento de azúcares, posteriormente se aplicó la cromatografía en columna para el resto de los compuestos.

3.2.3.1.1. Aislamiento de azúcares

Pasado el tiempo de reposo se evidenció la formación de cristales, mismos que fueron separando por filtración al vacío (Figura 36), a continuación, se realizó pruebas de solubilidad del precipitado de color verde y los cristales, para utilizarlos en la separación de los mismos.



Fuente: Elaboración propia

Figura 36. Proceso de separación de cristales

Se inició con lavados en porciones pequeñas con etanol para la eliminación del precipitado verde y finalmente con acetato de etilo, después se evaporó el solvente evitando la luz solar, obteniendo una masa de cristales (Figura 37).



Fuente: Elaboración propia

Figura 37. Proceso de separación de cristales

El proceso realizado a los cristales inició con el análisis de solubilidad en diferentes solventes con el propósito de separar el precipitado, luego se realizó una cromatografía de capa fina en diferentes fases móviles, así evidenciar la presencia de un compuesto aislado, finalmente se realizó la comparación en cromatografía con sacarosa (Figura 38) utilizando como fase móvil Etanol y revelador de H_2SO_4 30% (P/P) para una mejor visualización del color de la mancha se utilizó vapores de HCl.



Fuente: Elaboración propia

Figura 38. Cromatografía comparativa de azúcares

3.2.3.1.2. Separación y purificación de flavonoides totales por cromatografía

Una vez realizadas las pruebas al extracto etanólico, se disolvió una porción del extracto en acetato de etilo, posteriormente a este se agregó agua destilada, formando un precipitado blanco que fue separado como se observa en la figura 39.



Fuente: Elaboración propia

Figura 39. Separación por precipitación de la muestra

Una vez obtenido el extracto libre del precipitado se concentró a sequedad, se disolvió con etanol y se llevó a cromatografía en capa fina. Se realizó varias pruebas de distintas fases móviles para la mejor separación de componentes, teniendo como prioridad en primera instancia la eliminación de clorofila utilizando como fase móvil *Acetato de etilo: ácido acético: metanol: agua (17.6:1:1.7:1)* además se usó como revelador H_2SO_4 30% (P/P) como se observa en la figura 40.



Fuente: Elaboración propia

Figura 40. Cromatografía en columna del extracto etanólico

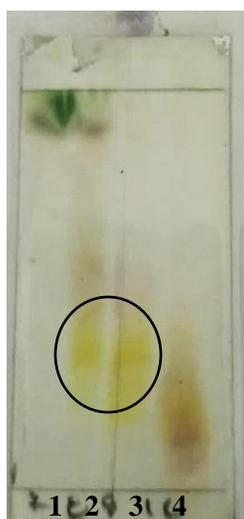
Una vez realizado la placa se llevó a cromatografía en columna obteniendo 4 fracciones, se realizó un monitoreo para cada fracción utilizando la cromatografía en capa fina, verificando la separación de las fracciones (Figura 41).



Fuente: Elaboración propia

Figura 41. Fracciones del extracto separado

Con un capilar de vidrio se tomó una cantidad reducida de muestra, que fue depositada en la placa cromatográfica, una vez realizado el sembrado de muestras se colocó esta placa en el frasco que contenía la fase móvil, evitando que las muestras toquen la misma, la fase fue ascendiendo mientras se separaban los componentes, una vez concluido el recorrido se evaporó el eluyente de la placa cromatográfica y se observó las manchas separadas, posteriormente se reveló la placa con ácido sulfúrico 30% (P/P) y se llevó al calor para la identificación de flavonoides presentes según las manchas obtenidas (Figura 42).



Fuente: Elaboración propia

Figura 42. Placa de las fracciones obtenidas del extracto etanólico

Se tomó la fracción 2 por el contenido de flavonoides totales, así se concentró esta fracción, luego se purificó con una fase móvil de acetato de etilo, se concentró y se guardó disuelto en etanol (Figura 43).



Fuente: Elaboración propia

Figura 43. Purificación de la fracción extraída

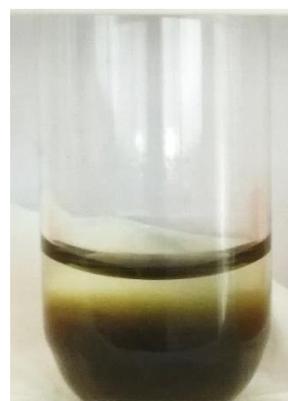
A la fracción 2 se realizó las pruebas cualitativas nuevamente, para verificar la presencia de flavonoides. (Figura 44).



Prueba de Shinoda



Prueba de álcalis



Prueba con FeCl_3

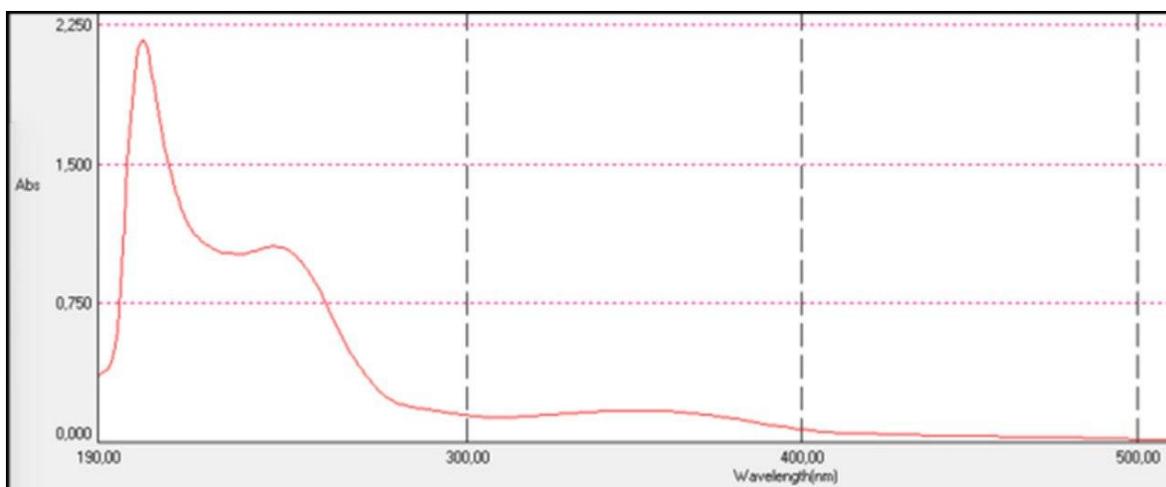
Fuente: Elaboración propia

Figura 44. Pruebas cualitativas de la fracción purificada

3.2.4. Cuantificación del extracto purificado

3.2.4.1. Espectroscopia UV – visible del extracto purificado

Se determinó el grado de absorbancia UV de la fracción 2. Este proceso fue realizado con un barrido en UV entre 225-450nm como longitud de onda, de estos espectros se observó las regiones correspondientes para determinar la presencia de flavonoides. (Figura 45).



Fuente: Elaboración propia

Figura 45. Espectro de la fracción purificada 1:10000

3.2.4.2. Determinación de actividad antioxidante

Se realizaron los siguientes métodos para la terminación de actividad antioxidante en la extracción purificada:

A. Método de DPPH: Según Mesa-Vanegas *et al.* (2015)

- Se colocó en un tubo 2970 μL de la solución preparada de DPPH y se mezcló con 30 μL de la solución del extracto (diferentes concentraciones). Se preparó el blanco colocando 2970 μL de la solución de DPPH con 30 μL de alcohol etílico.
- Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo oscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 517nm. Se repitió el procedimiento por triplicado de cada dilución. Se repitió el procedimiento con la solución patrón de ácido ascórbico preparado.
- Se calculó el porcentaje de captación de la actividad antioxidante con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ captación de DPPH} = \frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} * 100\%$$

B. Método de ABTS

- En un tubo de ensayo se colocó 1800 μL del radical ABTS ajustado.
- Posteriormente se adicionaron 600 μL del extracto diluido.

- Se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 754nm en diferentes tiempos de 10 y 30 minutos; se calculó el porcentaje de captación con la siguiente ecuación (Mamani, 2019):

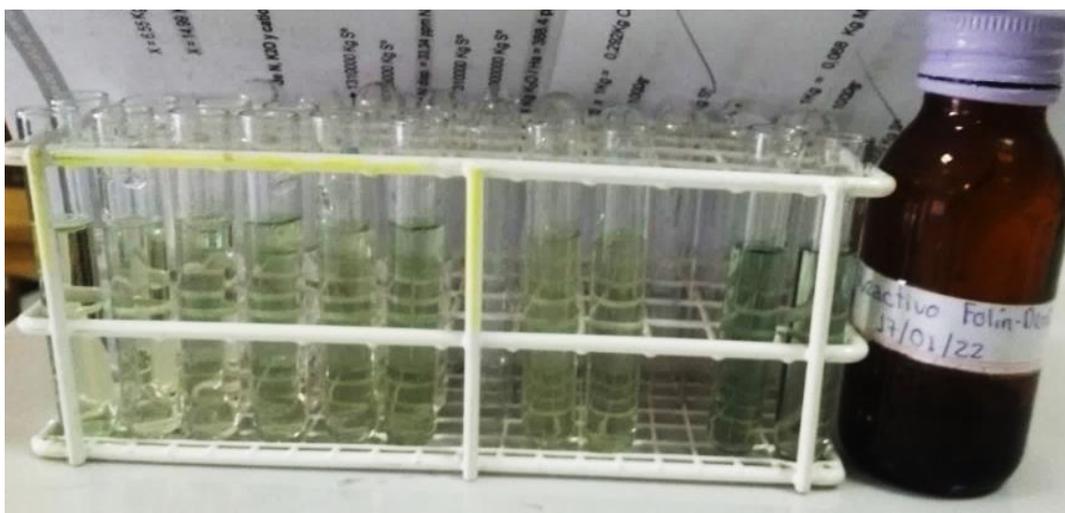
$$\% \text{ captación de ABTS} = \frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} * 100\%$$

El porcentaje de captación representa la pérdida de color azul-verde al inicio cuando se agregó el compuesto antioxidante se disminuyó la absorbancia que se leyó a los 10 y 30 minutos después de la reacción.

C. Método de Folin-Denis (fenoles solubles totales): De acuerdo a Palomino *et al.* (2009):

- En tubos de ensayo se colocó 150 μ L de cada patrón de pirogalol disuelto en etanol con diferentes concentraciones.
- Posteriormente se añadió 2400 μ L agua destilada y 300 μ L del reactivo de Folin, se agitaron y se dejó en reposo durante 8 minutos.
- Inmediatamente se adicionó 150 μ L de la solución de Na_2CO_3 al 20% (P/P), se guardaron durante 1 hora en la oscuridad.
- Para finalmente leer la absorbancia a 760nm contra su respectivo blanco, formando la curva de calibración.

Para la muestra se realizó el procedimiento anterior se colocó en un tubo de ensayo 150 μ L del extracto purificado reemplazando el patrón. (Figura 46).



Fuente: Elaboración propia

Figura 46. Método de Folin-Denis

3.2.4.3. Determinación de flavonoides totales por el método de AlCl_3

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Dini y Col (2010), mencionado por Nattes & Quispe (2018):

El contenido de flavonoides se determinó con el método de cloruro aluminico (AlCl_3), utilizando como patrón Quercetina, por tanto, los resultados fueron expresados en mg de quercetina sobre gramo de muestra.

De cada patrón se tomó $500 \mu\text{L}$, se mezcló con $3200 \mu\text{L}$ de agua destilada y $150 \mu\text{L}$ de NaNO_2 (5% p/p), se reposó durante 5 minutos, luego se agregó $150 \mu\text{L}$ de solución de AlCl_3 (10% p/p), se agitó y se guardó por 6 minutos. Finalmente se adicionó $1000 \mu\text{L}$ de solución de NaOH (1M). Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, inmediatamente se hizo la lectura a una absorbancia de 510nm. Para el blanco se sustituyó con agua destilada.

Del extracto se tomó $500 \mu\text{L}$ en la dilución adecuada, se mezcló con $3200 \mu\text{L}$ de agua destilada y $150 \mu\text{L}$ de NaNO_2 (5% p/p), se reposó durante 5 minutos, luego se agregó $150 \mu\text{L}$ de solución de AlCl_3 (10% p/p), se agitó y se guardó por 6 minutos. Finalmente se adicionó $1000 \mu\text{L}$ de solución de NaOH (1M). Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, inmediatamente se hizo la lectura a una absorbancia de 510nm, se realizó por triplicado cada dilución.

3.2.5. Formulación del producto

3.2.5.1. Formulación del gel

Se inició tamizando el Carbopol, utilizando una malla de 0.8mm, posteriormente se incorporó una parte del total de agua destilada, se hizo una agitación constante y blanda hasta que se obtuvo una apariencia homogénea, luego se agregó el restante de agua destilada con el extracto, alcohol isopropílico, glicerina y fragancia, incorporando con agitación constante, por último, se agregó la dietanolamina, mostrando una viscosidad mayor a la anterior, manteniendo el color inicial, homogenizando el producto final..

3.2.5.2. Control de calidad del producto formulado

3.2.5.2.1. Determinación organoléptica del gel

Se procedió al análisis de cuatro parámetros del producto terminado: aspecto, color, olor y textura, se reconoció los parámetros con los sentidos de tacto, vista y olfato.

3.2.5.2.2. Determinación del pH

Se realizó la determinación de pH para el aseguramiento que este dentro del rango permitido para el uso del producto en la piel.

Se pesó 1g del producto terminado y se disolvió con 10ml de agua destilada, posteriormente se colocó un pHmetro digital en la solución para medir el pH, este procedimiento se realizó por triplicado.

3.2.5.2.3. Determinación de extensibilidad

Extensión o extensibilidad de un gel se entiende como la capacidad para ser aplicado y distribuido uniformemente en la piel.

Se utilizó una placa larga, en donde se colocó papel milimétrico y se pesó 0.5g del producto terminado, se registró el radio inicial, se dejó 5 minutos y se registró el radio final, con estos datos se calculó el área de extensibilidad según la fórmula:

$$A_{\text{extensibilidad}} = \pi * r^2$$

3.2.5.2.4. Determinación de untuosidad

Se pesó 0.5g de gel que se aplicó sobre la piel y se cronometró el tiempo que se tardó en absorberse en la mano, se realizó el procedimiento por triplicado (Perez, Rodriguez & Morales, 2011).

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS

4.1. Rendimiento de extractos obtenidos

A partir de 500g de material vegetal (hojas de moringa) recolectado en el departamento de La Paz, que se desengrasaron con éter de petróleo (fracción 40/60) durante 3 días, se eliminó el solvente para posteriormente realizar las extracciones sólido-líquido con solventes de diferentes polaridades durante 7 días para finalmente concentrar en el rotaevaporador hasta casi sequedad.

Los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción de cada solvente son:

- Masa inicial de hojas de Moringa: 500g

Cuadro 14. Porcentaje de rendimiento de las extracciones (% P/P)

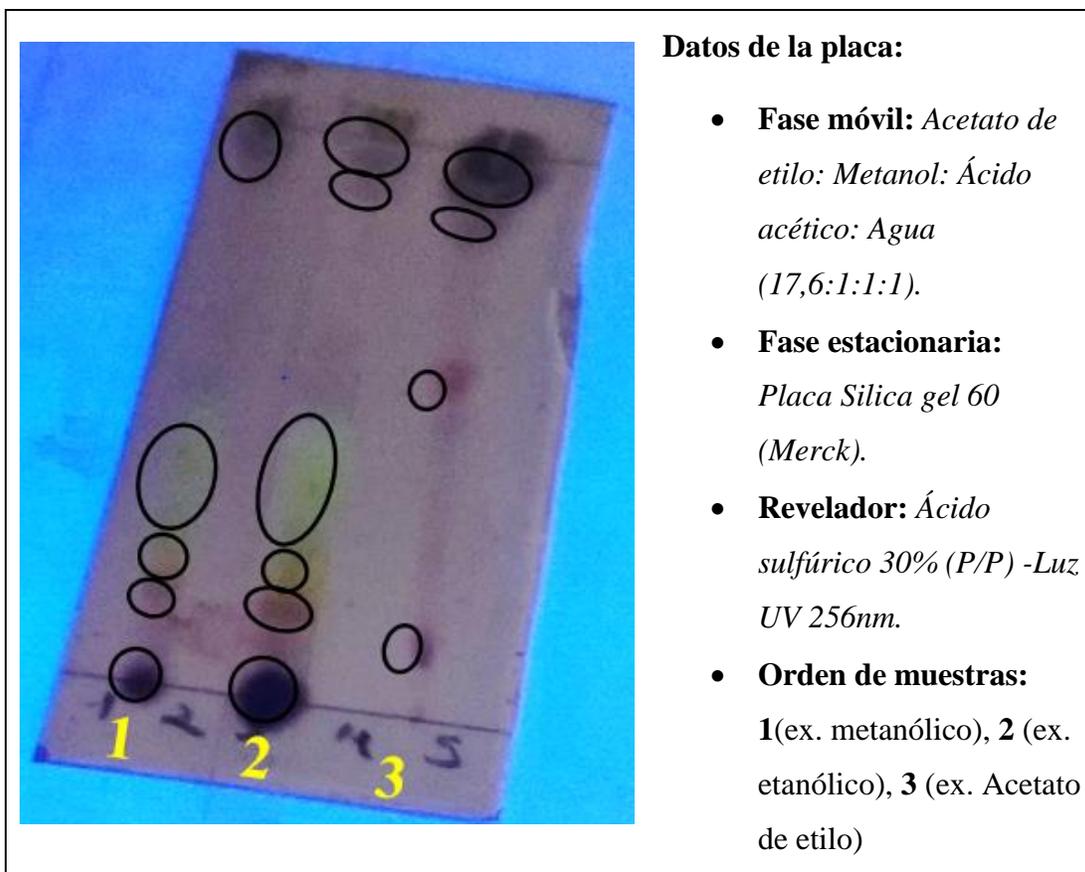
Extracto (solvente)	Porcentaje de rendimiento
Metanol	10.87%
Etanol	12.09%
Acetato de etilo	9.56%

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 14 presenta los porcentajes de rendimiento de cada solvente utilizado, se observa como el porcentaje menor perteneció al extracto con solvente acetato de etilo y el mayoritario es el extracto etanólico.

4.2. Comparación de extractos

Con los 3 extractos se realizó la cromatografía de capa fina, obteniendo los resultados presentados en la figura 47, donde se observa que el extracto etanólico poseía mayor cantidad de compuestos (manchas).



Fuente: Elaboración propia

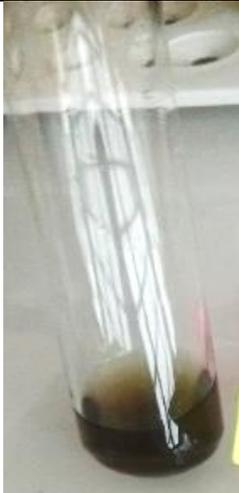
Figura 47. Placa cromatográfica de los diferentes extractos con luz UV

En la figura anterior se puede observar que la muestra 2 (extracto etanólico), posee similares manchas (compuestos) que el extracto metanólico, pero el tamaño de compuestos es ligeramente mayor (cantidad), mientras que el extracto con acetato de etilo es muy poco en cantidad los compuestos presentes casi todo el extracto ascendió en la placa.

4.3. Pruebas cualitativas de los diferentes extractos

Se realizaron las pruebas a los extractos en diluciones entre 1:100 a 1:10000 para observar mejor el cambio de coloración:

Cuadro 15. Pruebas fitoquímicas del extracto metanólico

Pruebas fitoquímicas		Extracto metanólico	
<i>Flavonoides (reacción de Shinoda)</i>	Presentó una coloración amarillenta suave, con un leve cambio de coloración respecto del inicial.		(+)
<i>Ensayo de álcalis</i>	Presentó una coloración amarillenta intensa.		(++)
<i>Compuestos fenólicos (reactivo de cloruro férrico)</i>	Presentó un oscurecimiento de la muestra color verde.		(++)

(-) no hay presencia; (+) poca presencia; (++) presencia confirmada.

Fuente: Elaboración propia

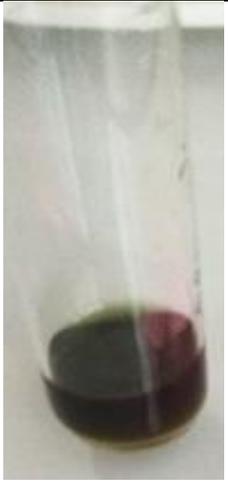
Cuadro 16. Pruebas fitoquímicas del extracto etanólico

Pruebas fitoquímicas		Extracto etanólico	
<i>Flavonoides (reacción de Shinoda)</i>	Presentó una coloración rojiza a rosado en la parte superior.		(++)
<i>Ensayo de álcalis</i>	Presentó una coloración naranja-amarillenta.		(++)
<i>Compuestos fenólicos (reactivo de cloruro férrico)</i>	Presentó oscurecimiento de la muestra a coloración verde azulado.		(++)

(-) no hay presencia; (+) poca presencia; (++) presencia confirmada.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 17. Pruebas fitoquímicas del extracto acetato de etilo

Pruebas fitoquímicas		Extracto de acetato de etilo	
<i>Flavonoides (reacción de Shinoda)</i>	No hubo cambio de coloración respecto del color inicial, pero generó una cantidad de espuma reducida.		(-)
<i>Ensayo de álcalis</i>	Presentó una leve aclaración del color inicial, pero no dentro de la gama amarillo-rojo.		(-)
<i>Compuestos fenólicos (reactivo de cloruro férrico)</i>	Presentó un oscurecimiento de color a verde azulado.		(+)

(-) no hay presencia; (+) poca presencia; (++) presencia confirmada.

Fuente: Elaboración propia

Los cuadros 15, 16 y 17 muestran los resultados obtenidos en cada prueba fitoquímica realizada en los diferentes extractos, evidenciando que en el extracto metanólico las pruebas fueron positivas, pero la prueba de Shinoda expresó poca presencia de flavonoides. En el extracto etanólico todas las pruebas fueron positivas por el cambio de coloración intenso observado, finalmente el extracto con acetato de etilo mostró resultados negativos o poca presencia en cada prueba.

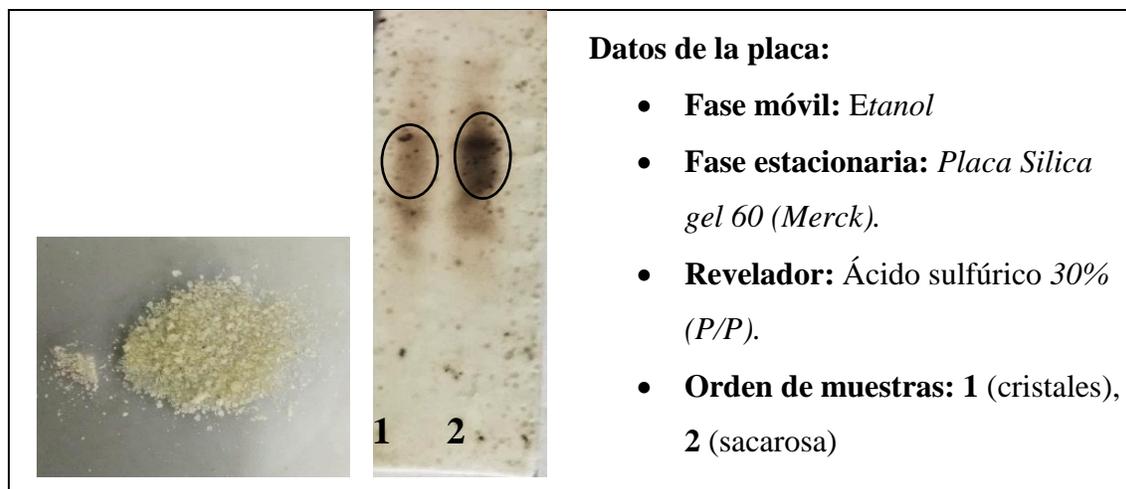
A partir de los resultados de la cromatografía en capa fina y las pruebas fitoquímicas, se decidió trabajar con el extracto etanólico por la presencia evidente en mayor cantidad de flavonoides.

4.4. Separación de flavonoides totales

4.4.1. Separación de azúcares presentes

Se realizó la separación de los cristales aplicando el principio de solubilidad, posteriormente se comparó por cromatografía en capa fina estos cristales con sacarosa.

- **Rendimiento de cristales:** 4.74% (Respecto del extracto etanólico)



Fuente: Elaboración propia

Figura 48. Cromatografía en capa fina de los azúcares separados

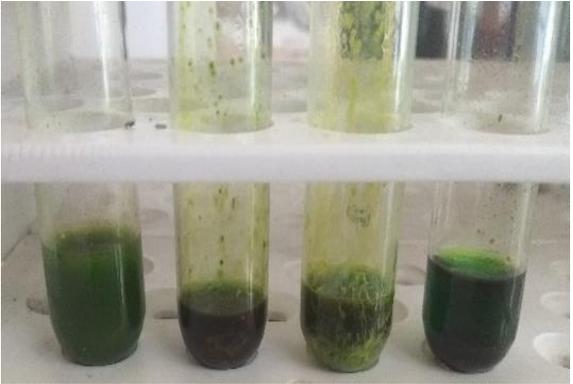
En la figura 48, se observa que los cristales tienen una forma cúbica de color blanco amarillento suave, la placa cromatográfica muestra similares manchas (distancia) que la sacarosa que fue usada como referencia, teniendo como conclusión que los cristales aislados pertenecen al grupo de los azúcares.

4.4.2. Separación y purificación de flavonoides totales

4.4.2.1. Pruebas de solubilidad

Una vez separado los cristales se procedió a realizar nuevamente las pruebas de solubilidad al extracto etanólico, la figura 49, muestra las pruebas realizadas al extracto con solventes de diferente polaridad, donde se evidencia, que al ser mezclado con acetato de etilo formó un precipitado blanco alrededor del tubo de ensayo, mismo que se separó del líquido y presentó el color blanco observado en la figura 50.

Una vez separado el precipitado se volvió a realizar una placa cromatográfica al extracto, donde se observó que el compuesto (mancha) que se quedó en la parte inferior de la placa anterior ya no está presente, por tanto, se separó uno de los compuestos.

Extracto etanólico	Solventes
 <p style="text-align: center;">1 2 3 4</p>	<p>(1) Agua destilada: turbidez, verde lechoso. (poco soluble)</p> <p>(2) Etanol: dilución del extracto. (soluble)</p> <p>(3) Acetato de etilo: formación de precipitado blanco. (poco soluble)</p> <p>(4) Éter de petróleo: aclaración del color. (poco soluble)</p>

Fuente: Elaboración propia

Figura 49. Pruebas de solubilidad al extracto etanólico.



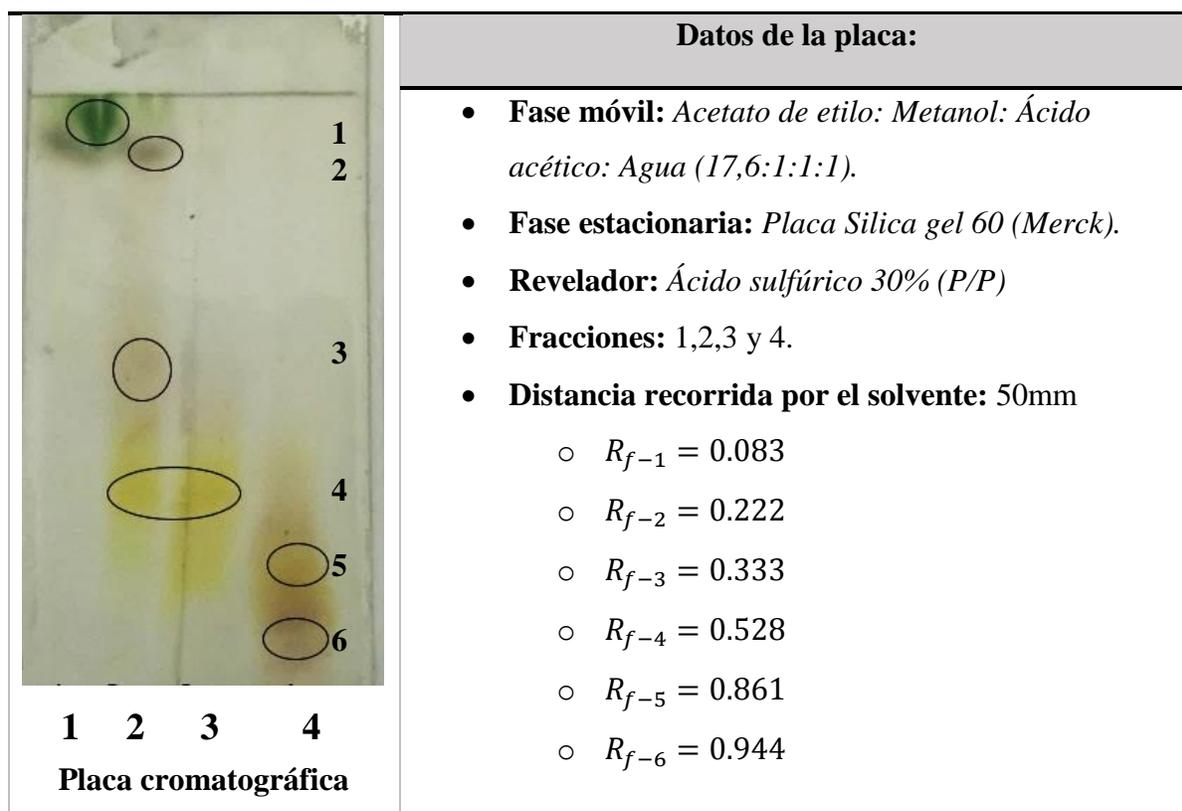
Fuente: Elaboración propia

Figura 50. Precipitado formado por la mezcla de acetato de etilo y extracto etanólico

4.4.2.2. Separación de los compuestos por cromatografía

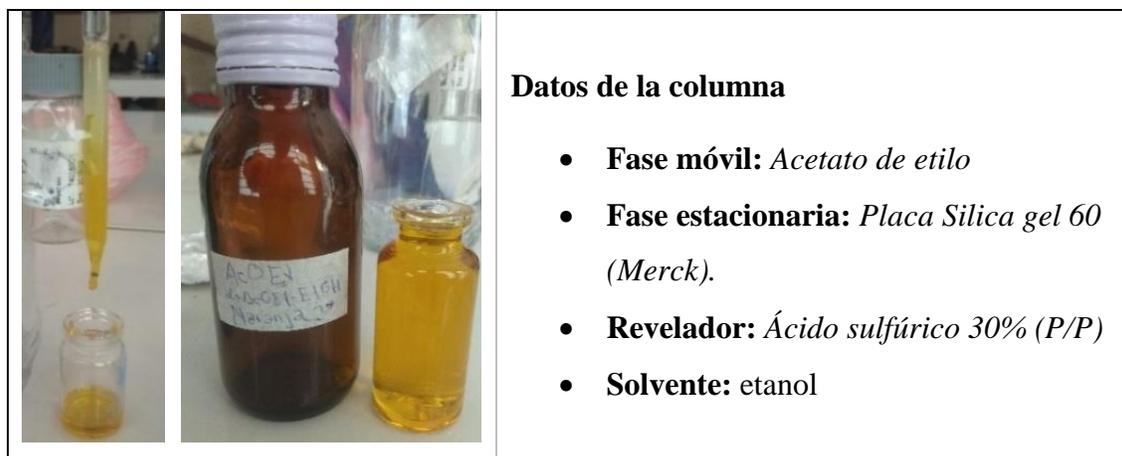
Se realizó la separación por cromatografía en columna y placa para visualizar las manchas de los compuestos de flavonoides.

La figura 51, muestra la cromatografía de las 4 fracciones separadas, a partir de la placa se eligió las fracciones 2 y 3 que presentaron similares manchas. Él trabajo fue desarrollado con ambas fracciones, volviendo a realizar la cromatografía en columna para realizar una separación en columna de las manchas, por presentar la coloración amarillenta, que evidencia la presencia de flavonoides. Finalmente se purificó la mancha obtenida, con acetato de etilo como fase móvil, que se observó en la figura 52.



Fuente: Elaboración propia

Figura 51. Placa cromatográfica de las fracciones obtenidas en columna.



Fuente: Elaboración propia

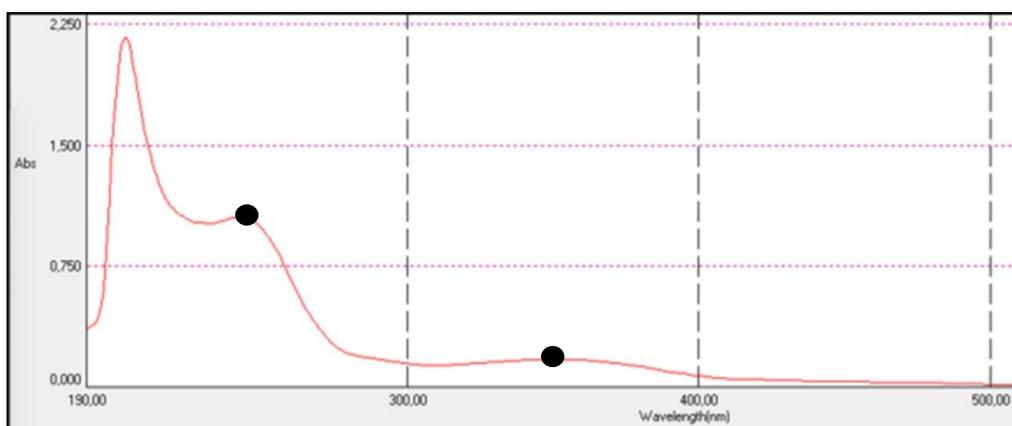
Figura 52. Purificación de los flavonoides totales

Una vez que se purificó la mancha, esta se concentró en rotaevaporador para disolverlo en etanol en una proporción 1:10, para su posterior análisis.

4.5. Análisis del compuesto purificado

4.5.1. Espectroscopia UV-Visble del extracto purificado

El análisis se realizó con el equipo espectrofotómetro, donde se verificó la presencia de flavonoides (Figura 53), el espectrograma muestra la actividad de la fracción separada del extracto etanólico en concentración 1:10000 formando dos puntos en el gráfico, entre las longitudes de onda de 190nm y 450nm, evidenciando la presencia de flavonoides ya que los valores de absorcion para las dos bandas estan entre 200 a 560nm según Lock (1988), pero la banda I presentó poca absorción por la dilución realizada.



Fuente: Elaboración propia

Figura 53. Espectro del extracto purificado

4.5.2. Determinación de actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante con el método DPPH y ABTS, además de la cuantificación por el método Folin-Denis.

4.5.2.1. Determinación por el método DPPH

Se evaluó la actividad antioxidante por el método DPPH, de la fracción purificada, a diferentes diluciones por triplicado.

Cuadro 18. Porcentaje de inhibición a diferentes diluciones por método DPPH.

Dilución	% de inhibición (promedio)	Desviación estandar	%C.V.	Resultado
1:10	88,311%	0.18	0.002	88.311± 0.18
1:100	15,437 %	0.30	0.020	15.437±0.30
1:1000	0.846 %	0.21	0.247	0.846±0.21

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 18, se observa los porcentajes de inhibición de la muestra, el promedio de la muestra 1:10 es de 88,311% que muestra el mayor porcentaje de inhibición de las diluciones, evidenciando la actividad antioxidante de la fracción purificada.

4.5.2.2. Determinación por el método ABTS

Se realizó a diferentes lecturas de diluciones y tiempos por triplicado el método.

Cuadro 19. Porcentaje de inhibición a diferentes diluciones para método ABTS

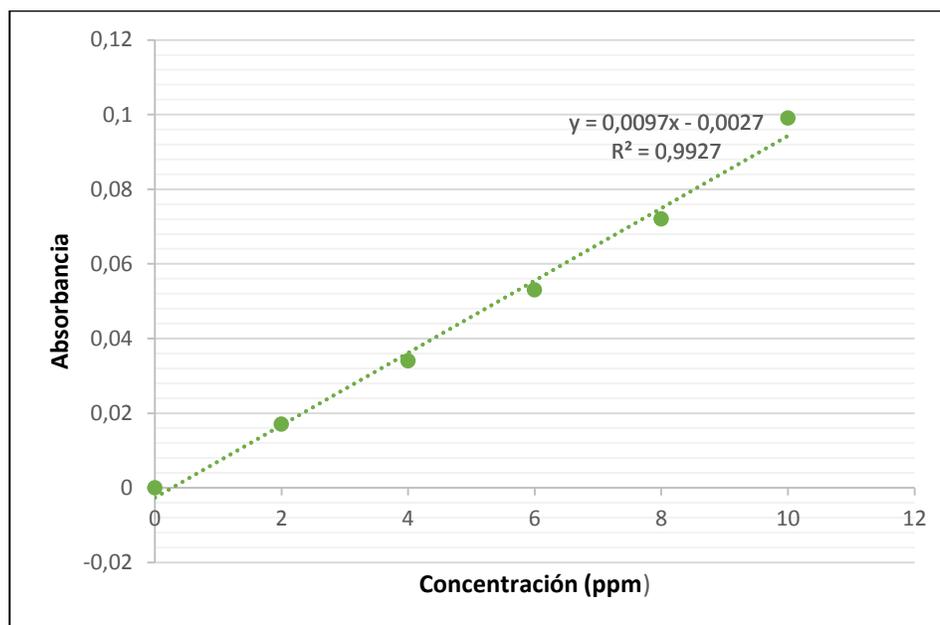
Dilución	Resultado (t=10min)	%C.V.	Resultado (t=30min)	%C.V.
1:10	99.864%	0.000	99.864%	0.000
1:100	34.692%	0.063	35,145%	0.059
1:1000	0.498%	0.417	1.585%	0.099

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 19, muestra el promedio de cada dilución, se observó que máximo porcentaje de inhibición esta en un tiempo de 10 y 30 minutos; diluido a 1:10, lo que significa que la capacidad inhibidora es mayor en en extracto concentrado.

4.5.2.3. Determinación por el método Follin Denis

El contenido de fenoles totales se expresó en mg del fenol en litro de extracto purificado, para ello se realizó la curva de calibración que se observa en la figura 54, posteriormente se realizaron las lecturas a diferentes concentraciones como se observa en el cuadro 19:



Fuente: Elaboración propia

Figura 54. Curva de calibración para fenoles totales con pirogalol

A partir de la curva de calibración se realizó la determinación de fenoles totales a diferentes concentraciones del extracto purificado:

Cuadro 20. Absorbancias promedio a diferentes diluciones para fenoles totales

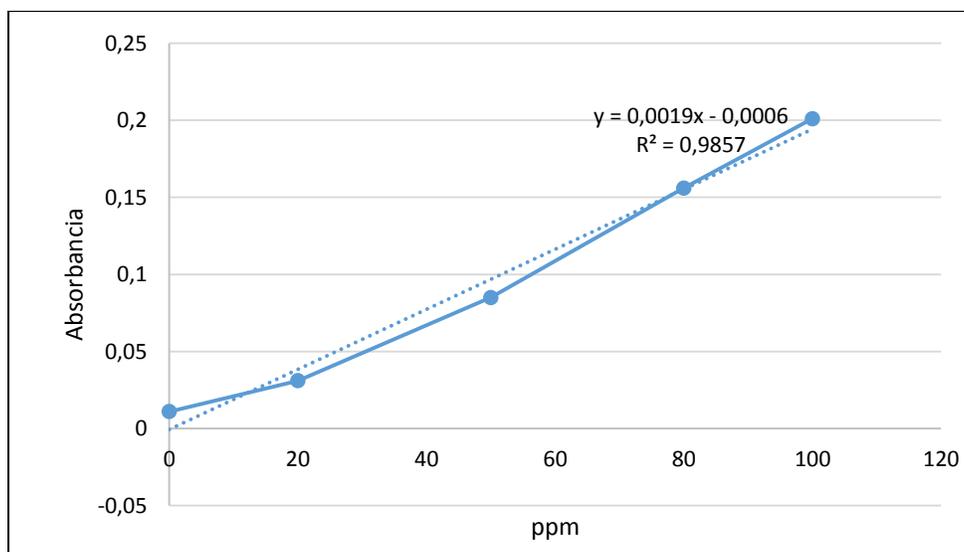
Dilución	Absorbancia	Desviación estandar	Concentración (ppm)
1:100	0.199	0.002	20.84
1:1000	0.013	0.001	1.60

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 20 muestra los resultados a dos diluciones, evidenciando que concentración mayor es de 20,84 mg de Pirogalol en 1 litro de extracto, a dilución 1:100, por tanto, la presencia de fenoles totales es considerable en el extracto etanólico.

4.5.3. Determinación de flavonoides totales

Se realizó la curva de calibración para calcular los flavonoides totales expresados en mg de quercetina por litro de muestra.



Fuente: Elaboración propia

Figura 55. Curva de calibración para flavonoides totales con quercetina

La figura 55, muestra la curva de calibración realizada con el patrón quercetina que se utilizó para la lectura de la muestra a diferentes diluciones, el cuadro 21 muestra que el mayor contenido fue de 216,37mg de Quercetina en un litro de extracto a dilución 1:10, evidenciando la presencia en cantidad de flavonoides en el extracto purificado.

Cuadro 21. Absorbancias a diferentes diluciones para flavonoides totales

Dilución	Absorbancia promedio	Desviación estandar	Concentración (ppm)
1:10	0.411	1.861	216.37
1:100	0.050	1.053	26.63
1:1000	0.004	2.596	2.60

Fuente: Elaboración propia

4.6. Formulación del producto

4.6.1. Formulación del gel

Se realizó la formulación del gel base del producto, considerando 3 formulaciones con la variación del porcentaje de carbopol:

Cuadro 22. Propuestas de formulaciones a diferentes porcentajes

Reactivos	Formulación A (%)	Formulación B (%)	Formulación C (%)
Agua destilada	71.89	71.89	71.89
Alcohol isopropílico	23.00	23.00	23.00
Carbopol	0.91	1.36	1.81
Trietanolamina	0.12	0.16	0.23
Glicerina	1.80	3.60	5.40

Fuente: Elaboración propia

A partir del cuadro 23, se realizó la selección del producto final, tomando en cuenta las características físicas comparadas con un gel comercial.

Cuadro 23. Descripción de las diferentes formulaciones

Formulación	Descripción del resultado
Formulación A	Gel homogéneo, una viscosidad baja, aplicación poco dificultosa por su consistencia presentada con una extensibilidad alta.
Formulación B	Gel homogéneo, una viscosidad promedio y aceptable, aplicación facil como un gel comercial, con una extensibilidad aceptable.
Formulación C	Gel homegéneo, con una viscosidad alta, gomosa, aplicación poco dificultosa y aceptable.

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 56. Formulaciones propuestas para el gel

De las 3 formulaciones se descartó A y C por las características no satisfactorias presentadas en el cuadro 23, por tanto, se trabajó con la formulación B para la mezcla con el extracto, pues la homogeneidad, consistencia y untuosidad era similar al gel del mercado.

○ **Formulación del gel con el extracto purificado**

A partir de la formulación aceptada, se realizó la formulación completa del gel con la fracción purificada además de otros reactivos que completan la formulación del gel, como se observa en el cuadro 24:

Cuadro 24. Formulación del gel

Reactivos	Composición (%)
Agua destilada	69.86
Alcohol isopropílico	21.00
Carbopol	1.36
Trietanolamina	0.75
Glicerina	3.60
Extracto	2.40
Fragancia	0.03
Conservante	1.00

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 57. Formulación final con el extracto purificado.

La formulación final presentó un aspecto aceptable y una consistencia adecuada sobre la piel.

4.6.2. Control de calidad del producto terminado

Al producto propuesto se le realizaron pruebas de control de calidad básicos para la verificación de la calidad presentada.

4.6.2.1. Análisis organoléptico

El cuadro 25, muestra las sensaciones evaluadas por los sentidos, mismos que se comparan al gel comercial.

Cuadro 25. Resultados del análisis organoléptico al producto

Parámetro	Descripción del gel
Aspecto	Agradable, brillante similar a los geles.
Color	Amarillo suave.
Olor	Similar a etanol diluido y dulce.
Textura	Suave y ligera al contacto

Fuente: Elaboración propia

4.6.2.2. Determinación de pH

Se pudo observar en el cuadro 26, el pH registrado con el pHmetro digital que se encuentra en un promedio de 5.4, si el rango adecuado para la piel (5.0-5,7), estos valores muestran que el gel son ligeramente ácidos, que es adecuado para la estabilidad de los compuestos fenólicos e impidiendo el crecimiento de bacterias.

Cuadro 26. Resultados del pH al producto

pH	Criterio
5.3	Aceptado
5.5	Aceptado
5.5	Aceptado

Fuente: Elaboración propia

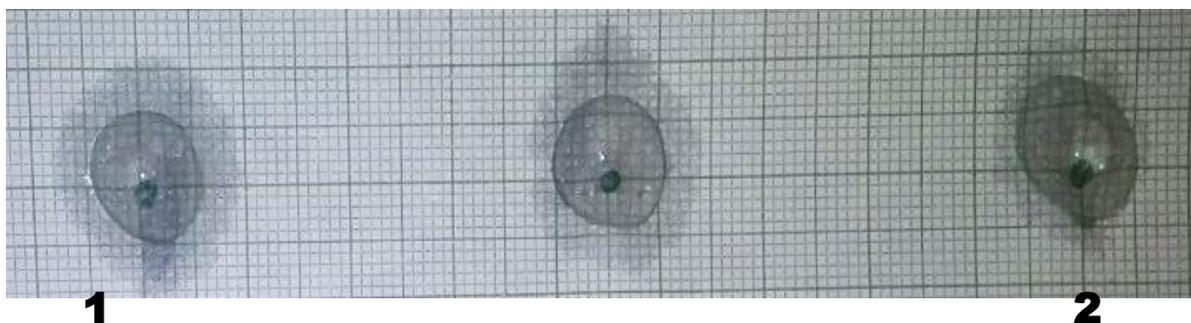
4.6.2.3. Determinación de extensibilidad

El cuadro 27, muestra las áreas iniciales y finales del producto, teniendo una diferencia promedio de 906.85mm² de extensión a partir de una masa de 0.55g demostrando que tiene una fácil extensibilidad.

Cuadro 27. Resultados de la extensibilidad del producto.

Promedio de área inicial (A_i mm ²)	Promedio de área final (A_f mm ²)	%C.V.
78.54	1017.85	0.184
78.54	1134.08	
78.54	804.22	

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 58. Extensibilidad del producto.

4.6.2.4. Determinación de untuosidad

Cuadro 28. Resultados de untuosidad del producto

Masa de muestra (g)	Tiempo de absorción (s)	%C.V.
0.50	65	0.023
0.50	67	
0.51	68	

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 59. Untuosidad del producto

El cuadro 28 muestra la absorción en la piel que tuvo el gel, a partir de una masa de 0.50 g en un tiempo promedio de 67 segundos siendo este aceptable para un gel con el tipo de composición.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó las extracciones a partir de las hojas de Moringa oleífera desengrasadas con solventes de diferentes polaridades por el método de extracción sólido- líquido obteniendo rendimientos de: 10.87% con metanol, 12.09% con etanol y 9.56% con acetato de etilo, de estos extractos el que presenta mayor rendimiento es con etanol.
- ✓ Se realizaron pruebas fitoquímicas y cromatográficas a los extractos, evidenciando la presencia de flavonoides por las pruebas cualitativas positivas y la cromatografía en capa fina principalmente el extracto etanólico que mostró presencia de mayor cantidad de manchas (compuestos) entre los demás extractos.
- ✓ Al extracto etanólico que tuvo mayor presencia de compuestos, se realizó la separación y purificación de flavonoides presentes por cromatografía en columna logrando una fracción purificada, que se le realizó las pruebas fitoquímicas dando positivas, así se demostró la presencia de flavonoides totales.
- ✓ Se hizo el barrido espectral a la fracción purificada, mismo que justificó la presencia de los flavonoides en la muestra, por la formación de dos bandas generadas dentro del rango de las longitudes de onda.
- ✓ Se evaluó la actividad antioxidante de la fracción purificada por 3 métodos presentando los mayores resultados de: el método de DPPH con un porcentaje de inhibición 88.311 ± 0.18 % en una dilución 1:10, método ABTS con un porcentaje de inhibición de 99.864% en dilución 1:10 y fenoles totales con el método Folin-Denis dando como resultado de 20.84 ppm en una dilución 1:100.
- ✓ Se cuantificó los flavonoides totales de la fracción purificada con el método del $AlCl_3$ por espectrofotometría UV-Visible, dando un resultado de 216.37 mg quercetina/L, en la dilución 1:10.
- ✓ Se elaboró una formulación para un producto a partir de la fracción purificada en forma de gel con uso analgésico, que se obtuvo a partir de las hojas de Moringa oleífera, a este se le realizaron pruebas de control de calidad como producto terminado.

CAPÍTULO VI.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un análisis completo al extracto etanólico para la obtención de un producto apto para el mercado, debido a su alto rendimiento.
- ✓ Realizar pruebas farmacológicas “in vivo” del extracto y producto terminado.
- ✓ Realizar pruebas de estabilidad al extracto purificado y producto terminado, para que se pueda comercializar en el mercado.
- ✓ Realizar las pruebas microbiológicas al extracto y producto terminado como la actividad antibacteriana, para su uso en la población.
- ✓ Ejecutar pruebas con técnicas instrumentales más sensibles como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas e infrarroja, para la determinación de las moléculas presentes.

CAPÍTULO VII.

BIBLIOGRAFÍA

- Apaza Cora, C. P. (2016). *Implementación de una planta piloto de extracción de aceite esencial de Moringa* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés.
- Aragón, X. del P., & Herrera, F. (2016). *Evaluación del efecto de la semilla de Moringa oleífera como alimentación alternativa para broilers en el campos agropecuario, de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria de la UNAN León*. [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Arias, C. (2014). *Estudio de las posibles zonas de introducción de la Moringa oleífera Lam. En la península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Politécnica de Madrid.
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2, 27.
- Bello, A., & Camargo, M. (2018). *Identificación de flavonoides en inflorescencias de Chomolaena tacona (Klatt) R.M. King & H. Rob y determinación de su actividad antioxidante* [Tesis para optar el grado de licenciatura]. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.).
- Bonilla Ríos, N. C., Varón, F., & Garzón, L. (2014). Extracción de pigmentos colorantes tipo flavonoides, flor del pomo (*Syzygium jambos*) zona verde del Iear Florencia Caquetá. *Revista Amazonia Investiga*, 3, 34-42.
- Canett-Romero, R., Arvayo-Mata, K. L., & Ruvalcaba-Garfias, N. V. (2014). Aspectos tóxicos más relevantes de Moringa oleífera y sus posibles daños. *BIOtecnia*, 16(2), 36. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i2.45>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 22(2), 5-14.
- Corzo, A. (2019). *Técnicas de análisis en química orgánica Cromatografía* (1ra ed., p. 55). UNSE Universidad Nacional de Santiago del Estero.
-

- Cuesta, O., Márquez, I., & Campo, M. (2015). *Introducción a la caracterización estructural de flavonoides* (Primera). Concepto.
- Delporte, C., Peña, M., & Valenzuela, G. (2014). *Guía de trabajos prácticos farmacognosia*. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica.
- Díaz, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrián, J., Peinado, J., Meléndez-Valdés, F., & Túnez, I. (2008). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-Córdoba*, 8.
- Doménech Asensi, G., Durango Villadiego, A. M., & Ros Berruezo, G. (2017). Moringa oleifera: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 67 N° 2, 12.
- Enriquez Espinoza, R., Pacovich Michaga, R., Nogales Suaznabar, G., & Zabala Montero, Y. (2013). *Desarrollo agroindustrial y nutrición en la Amazonía: Moringa, asaí, majo y copoazú* (Universidad Amazónica de Pando). Fundación PIEB.
- Estrada Reyes, R., Ubaldo Suárez, D., & Araujo Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 35(5), 10.
- Estrada-Hernández, O., Hernández Rodríguez, O. A., & Guerrero Prieto, V. M. (2016). Múltiples formas de aprovechar los beneficios de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). *Tecnociencia Chihuahua*, X N° 2, 101-108.
- Farmacognosia. (s.f.). Glicosidos II y táninos. En *Libro de prácticas*.
- FarmUpibi. (2015, abril 5). Formulación de geles [Prácticas de laboratorio de ingeniería farmacéutica]. *Farm Upibi*. <http://farmupibi.blogspot.com/2015/04/formulacion-de-geles.html>
- Folkard, G., & Sutherland, J. (2000). Moringa oleifera un árbol con enormes potencialidades. *AGROFORESTERIA EN LAS AMERICAS*, 8, 5.
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2012). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *ETSIAMN, Universitat Politècnica de València*, 9.

- García, R. (2017). Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de Moringa oleifera de diferente origen geográfico. *Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología*, 27.
- Gastón Federico, A. (2016). *Evaluación del contenido de polifenoles en alimentos vegetales, en función del método de conservación empleado* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Nacional de Cuyo.
- Gómez Gómez, K. P. (2013). *Evaluación de rendimiento de extracción y caracterización fitoquímica de la fracción extraíble de semilla de Moringa (Moringa oleifera Lam.) a nivel laboratorio* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Lezcano, Y., Soca, M., Sánchez, L. M., Ojeda, F., Olivera, Y., & Montejo, I. L. (2012). *Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray* *Qualitative characterization of the content of secondary metabolites in the edible fraction of Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray*. 35(3), 10.
- Lock, O. (1988). *Investigación fitoquímica* (FONDO, Vol. 18). Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Lock, O., Cabello, I., & Doroteo, V. H. (2006). PRÁCTICA VI.6 ANÁLISIS DE FLAVONOIDES EN PLANTAS. *Ponifica Universidad Católica del Perú*, 11.
- López, B., Ortonobes, S., & García, C. (2015). *Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas: ¿es todo lo mismo?* (Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria., Vol. 8).
- López, T. (2002). Flavonoides. *Ámbito farmacéutico*, 21, 6.
- Madrigal, H., & Avalos, T. (2012). Moringa oleífera. *INIFAP*, 27.
- Mamani, A. (2019). *Propuesta de formulación de un producto a partir de aceites esenciales de especies aromáticas del sector valle de La Paz extraído por arrastre de vapor y fluidos supercríticos* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés.
-

- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., & Culebras, J. M. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 6, 8.
- Mesa-Vanegas, A., Zapata-Urbe, S., Arana, L. M., Zapana, I., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 11.
- Nattes, P., & Quispe, Z. (2018). *Deteminación de la actividad antibacteriana de los extractos de ayrampu (Opuntia soehrensii) para el desarrollo galénico de un gel de limpieza de manos* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés.
- Neira, A. (2009). *Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible Prosthechea michucana* [Tesis para optar el grado de Magister]. Escuela nacional de ciencias biológicas sección de estudios de posgrado e investigación departamento de graduados e investigación en alimentos.
- Olvera, G. C., Cuevas, D. Z., & Inungaray, M. L. C. (2017). Análisis fitoquímico: Una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *TLATEMOANI*, 24, 16.
- Orjuela, A. (2015). *Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de Chomolaena pergrábra (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson* [Tesina para obtener el título de licenciado]. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA.
- Oviedo, K., & Escobar, M. (2020). *Propuesta para la elaboración de un gel antibacterial con base en las hojas de Moringa oleifera Lam. (Moringaceae) cultivada en Colombia* [Para optar el grado de licenciatura]. Fundación Universidad de América.
- Palomino, Lady, García, C., Gil, J., Rojano, B., & Durango, D. (2009, agosto 15). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 16, 388-395.
-

- Pérez Freire, M. (2011). *Separación de metabolitos secundarios de pulpa de caña de fistula (Cassia fistula) utilizada como espectorante* [Para optar el grado de licenciatura]. Escuela superior Politecnica de Chimborazo.
- Robles García, M. A., Aguilar, A., Gutiérrez, M., Rodríguez, F., Morales, J., Guerrero Medina, J., Madrigal, J., & Del Torro, C. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 12, 6.
- Rojas A., L., Jaramillo J., C., & Lemus B., M. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas*. Machala: Ecuador. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6653>
- Salamanca Maqueda, N. (2012). *Identificación de principios activos en las hojas de Solanum pallidum como fuente potencial para usos terapéuticos* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés.
- Sánchez Peña, Y. A., Martínez Avila, G., Sinagawa Garcia, S. R., & Vázquez Rodríguez, J. A. (2013). Moringa Oleifera; Importancia, Funcionalidad y Estudios Involucrados. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5 (N° 9), 7.
- Uquillas Almeida, N. J. (2017). *Moringa y su uso culinario* [Para optar el grado de licenciatura]. Universidad de Los Hemisferios.
- Vélez-Terranova, M., Campos Gaona, R., & Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 12.

CAPÍTULO VIII.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los reactivos y curva del método DPPH

- *Preparación del reactivo de DPPH:* Se preparó la solución madre de DPPH pesando 20mg de este reactivo que se disolvió en 10ml de metanol al 80%, posteriormente se realizó una dilución 1:10, tomando una alícuota de 250 μ L aforado a 25ml de metanol.
- *Preparación de la curva de calibración:* se pesó 20mg del referente ácido ascórbico disuelto en 10ml, posteriormente a este se realizó una dilución 1:10, a partir de esta dilución se preparó la curva de calibración tomando distintas cantidades de solución.

Anexo 2. Preparación de los reactivos y curva del método ABTS

- *Preparación del reactivo ABTS:* Se pesó 50mg del reactivo ABTS y se disolvió en 50ml de agua desionizada, posteriormente se adicionó 2.45mg de $K_2S_2O_8$ (persulfato de potasio), la solución se dejó en reposo durante 48 horas en la oscuridad. A continuación, se diluyó con etanol hasta llegar a una absorbancia entre 0.750 ± 0.050 a 754nm (ajustado experimentalmente).
- *Preparación de la curva de calibración:* Se preparó una solución con 25mg de ácido ascórbico en 50mL de metanol, de esta solución madre se realizó diluciones para la curva de calibración.

Anexo 3. Preparación de los reactivos y curva del método Folin-Denis

- *Preparación de la curva de calibración:* Se preparó el referente pirogalol pesando 10mg de este, para aforarlo con etanol en un matraz de 25ml, posteriormente se realizó una dilución 1:10 a partir de una alícuota de 10ml que se aforo a 100ml con etanol, a partir de esta dilución se preparó la curva de calibración tomando distintas cantidades de solución.

- *Preparación de Na_2CO_3 al 20% (P/P):* se pesó 2g del reactivo y se aforó en un matraz de 10ml con agua destilada.

Anexo 4. Preparación de los reactivos y curva del método AlCl_3

- *Preparación de la curva de calibración:* Se pesó 25mg de Quercetina que se diluyó en etanol, posteriormente se aforó a 25ml, de esta solución se realizó una dilución 1/20 que se aforó a 10ml, a partir de esta solución se realizó diluciones a diferentes concentraciones.
- *Preparación de NaNO_2 (5% P/P):* Se pesó 0.5g de la sal que se diluyó con agua destilada, posteriormente se aforó a 10ml.
- *Preparación de AlCl_3 (10% P/P):* Se pesó 1.81g de cloruro de aluminio hexahidratado, fue disuelto en agua destilada, luego se aforó en un matraz de 10ml.
- *Preparación de NaOH (1M):* Se pesó 1g de hidróxido de sodio que se disolvió con precaución con agua destilada, posteriormente se aforó a 25ml.

Anexo 5. Datos experimentales para la determinación de rendimiento en extractos

El rendimiento de cada extracto se obtuvo por la siguiente expresión:

$$\%rendimiento = \frac{masa_{concentrado}}{masa_{muestra}} * 100\%$$

Datos experimentales:

Disolvente usado	Masa inicial (g)	Masa del extracto (g)
Metanol	158.3578	17.2133
Etanol	159.0103	19.2246
Acetato de etilo	155.2842	14.8452

Anexo 6. Datos experimentales para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH

Dilución	Blanco (abs) 0,827		Promedio de % de inhibición	Desviación Estándar	%C.V.
	Absorbancia	% de inhibición			
1 : 10	0,097	88,271			
1 : 10	0,095	88,513	88,311	0,185	0,002
1 : 10	0,098	88,150			
1 : 100	0,697	15,719			
1 : 100	0,702	15,115	15,437	0,304	0,020
1 : 100	0,699	15,478			
1 : 1000	0,819	0,967			
1 : 1000	0,819	0,967	0,846	0,209	0,247
1 : 1000	0,822	0,605			

Anexo 7. Datos experimentales para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH

Para un tiempo de 10 minutos, absorbancia del blanco es 0.736

Dilución	Absorbancia	% de inhibición	Promedio de % de inhibición	Desviación estándar	%C.V.
1 10	0,001	99,864			
1 10	0,001	99,864	99,864	0,000	0,000
1 100	0,489	33,560			
1 100	0,491	33,288	34,692	2,201	0,063
1 100	0,462	37,228			

1 1000	0,731	0,679			
1 1000	0,734	0,272	0,498	0,208	0,417
1 1000	0,732	0,543			

Para un tiempo de 30 min, absorbancia del blanco es 0.736

Dilución	Absorbancia	% de inhibición	Promedio de % de inhibición	Desviación estándar	%C.V.
1 10	0,001	99,864			
1 10	0,001	99,864	99,864	0,000	0,000
1 100	0,484	34,239			
1 100	0,488	33,696	35,145	2,058	0,059
1 100	0,460	37,500			
1 1000	0,725	1,495			
1 1000	0,725	1,495	1,585	0,157	0,099
1 1000	0,723	1,766			

Anexo 8. Datos experimentales para la curva de calibración de fenoles totales con pirogalol

Concentración del patrón (ppm)	Absorbancia
0	0
2	0,017
4	0,034
6	0,053
8	0,072
10	0,099

Anexo 9. Datos experimentales de la muestra en la determinación de fenoles totales

Dilución	Absorbancia	Concentración (ppm)	Promedio de concentración (ppm)	Desviación estándar	%C.V.
1 100	0,201	21,044			
1 100	0,197	20,640	20.854	0,002	0,010
1 100	0,199	20,879			
1 1000	0,012	1,549			
1 1000	0,013	1,650	1.599	0,001	0,048
1 1000	0,012	1,598			

Anexo 10. Datos experimentales para la curva de calibración para flavonoides totales con Quercetina

Concentración del patrón (ppm)	Absorbancia
0	0,011
20	0,031
50	0,085

80	0,156
100	0,201

Anexo 11. Datos experimentales de la muestra en la determinación de flavonoides totales.

Dilución	Absorbancia	Concentración (ppm)	Promedio de concentración (ppm)	Desviación estándar	%C.V.
1 10	0,408	215,05	216,36	1,861	0,009
1 10	0,413	217,68			
1 100	0,05	26,63	26,63	1,053	0,040
1 100	0,048	25,58			
1 100	0,052	27,68			
1 1000	0,004	2,42	2,60	0,304	0,117
1 1000	0,005	2,95			
1 1000	0,004	2,42			
