

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS DE HOJAS DE *Moringa oleífera* “MORINGA” Y SU
RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE QUERCETINA, AREQUIPA,
2018-2019.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Berlanga Cruz, Gabriela Candelaria

para optar el Título Profesional de:

Química Farmacéutica

Asesor:

Dr. Cárdenas García, Jaime Dante

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000022390

N° Trámite en Fac. 1749-2018

Fecha 16-05-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: BERLANGA CRUZ, Gabriela Candelaria

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE Moringa oleifera "MORINGA" POR EL METODO INDOFENOL Y HPLC, AREQUIPA 2018-2019"

DICTAMINADORES: 1) Dr. José Villanueva Salas 2) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, sugerimos se cambie el título a: "DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE Moringa oleifera "MORINGA" Y SU RELACION CON EL CONTENIDO DE QUERCETINA, AREQUIPA, 2018-2019" después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firmas:

(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha

22/06/18

ASESOR: Dr. Jaime Cárdenas García

DICTAMEN DE ASESOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesor en el presente Trabajo de Investigación, cumpla con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma

Fecha

13/6/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) Dr. Alberto Briceño Ortega
2) Dr. José Villanueva Salas

3) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE BORRADOR:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma

(Devolver antes de 15 días hábiles)

Fecha

28/06/19

JURADOS: Presidente DR. ALBERTO BRICEÑO ORTEGA
Vocal DR. JOSE VILLANUEVA SALAS
Secretario MAG. JULITZA PAREDES FUENTES

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 9/7/19

Hora: 18.00

Local: C- 402 (SUM)

DECANO

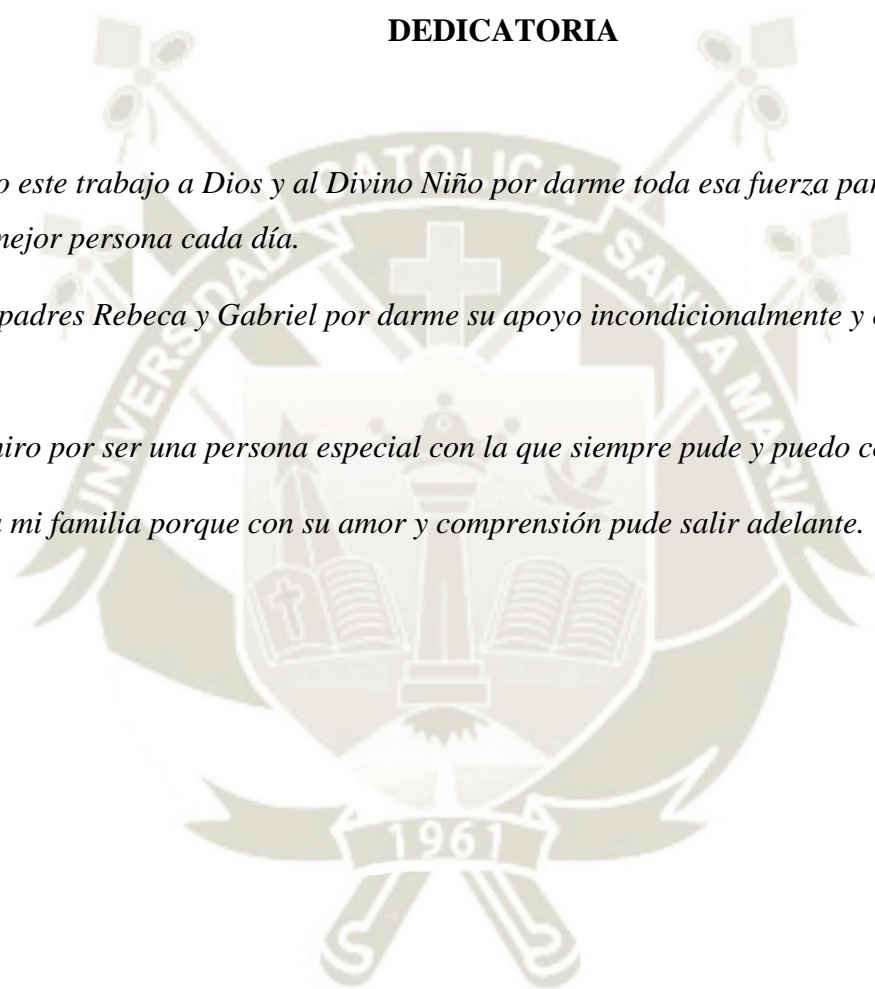
DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y al Divino Niño por darme toda esa fuerza para salir adelante y ser mejor persona cada día.

A mis padres Rebeca y Gabriel por darme su apoyo incondicionalmente y creer siempre en mí.

A Ramiro por ser una persona especial con la que siempre pude y puedo contar.

A toda mi familia porque con su amor y comprensión pude salir adelante.



AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento pleno a Dios, al Divino Niño y a la Virgen de la Candelaria porque sin su ayuda, fuerza y aliento no estaría aquí hoy.

A mis padres Rebeca y Gabriel porque siempre estuvieron a mi lado dándome la energía necesaria para seguir adelante.

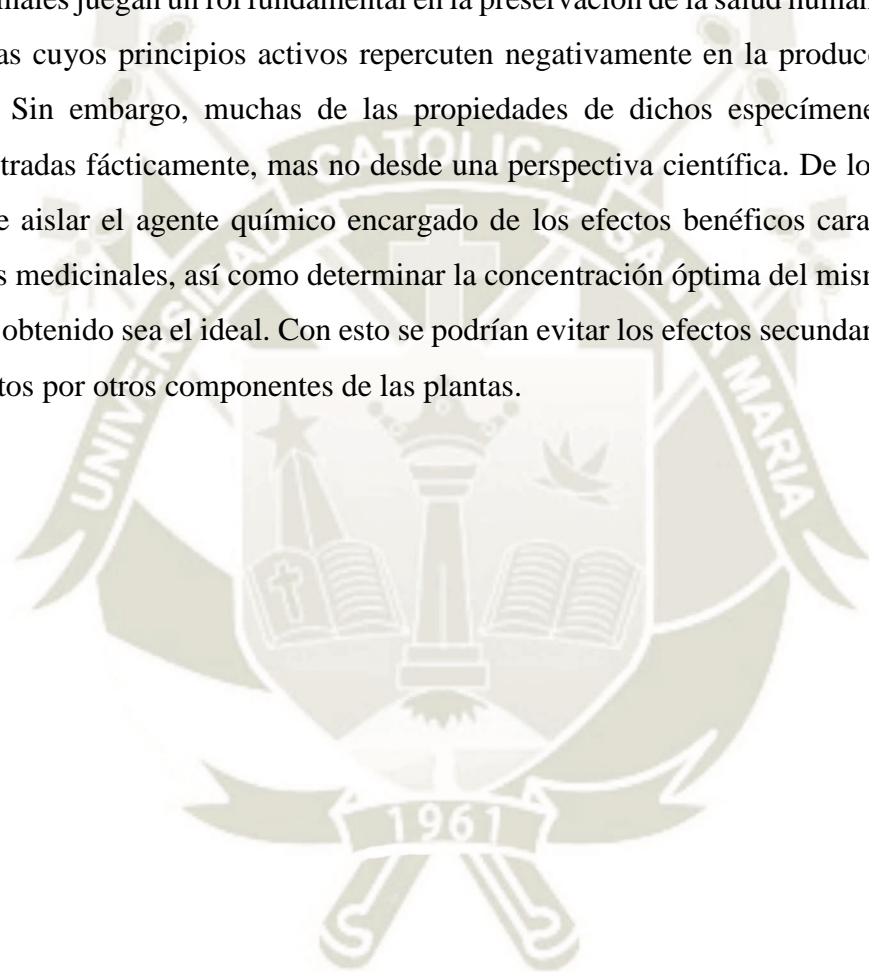
A Ramiro porque nunca dejó de creer en mí.

A mi asesor el Dr. Cárdenas García, Jaime por brindarme su apoyo y sabios consejos en la realización de esta tesis.

A mis jurados el Dr. Alberto Briceño Ortega, Al Dr. José Villanueva Salas y a la Mgter. Julitza Paredes Fuentes por brindarme su tiempo y consejos para la realización de esta tesis.

INTRODUCCIÓN

El estrés y las enfermedades degenerativas representan a dos de los mayores flagelos en la salud pública a nivel mundial, esto debido a la frecuente exposición a los agentes etiológicos por parte de la población, desencadenando la enfermedad y reduciendo la capacidad productiva de la población referida. En nuestro medio es bien sabido que las plantas medicinales juegan un rol fundamental en la preservación de la salud humana, lo cual incluye aquellas cuyos principios activos repercuten negativamente en la producción de radicales libres. Sin embargo, muchas de las propiedades de dichos especímenes solo han sido demostradas fácticamente, mas no desde una perspectiva científica. De lograrse esto, sería posible aislar el agente químico encargado de los efectos benéficos característicos de las plantas medicinales, así como determinar la concentración óptima del mismo, con la cual el efecto obtenido sea el ideal. Con esto se podrían evitar los efectos secundarios o indeseables provistos por otros componentes de las plantas.



RESUMEN

Existen procesos patológicos atribuibles razonablemente a los radicales libres los cuales están involucrados en algunas de las fases o secuencias bioquímicas del estrés oxidativo. Recientemente el estudio de los fitoquímicos los cataloga como elementos nutricionales de amplia importancia en la incorporación de la dieta, ya que entre su actividad farmacológica destaca la capacidad antioxidante, contrarrestando a los radicales libres e inhibiendo el desarrollo del estrés oxidativo.

El objetivo del presente estudio consistió en determinar la capacidad antioxidante de los extractos vegetales de *Moringa oleifera* y correlacionarlos con su contenido de quercetina. Para ello se realizó extracción de la matriz vegetal por el método continuo de percolación, utilizando tres sistemas de solventes: metanol, éter dietílico y hexano. Los extractos fueron concentrados utilizando el rotavapor y se evaluó su capacidad antioxidante reductora de cobre (método CUPRAC) utilizando ácido ascórbico como material de referencia. Se determinó la concentración de quercetina en los extractos vegetales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se correlacionó la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* con su concentración de quercetina.

Se determinó la concentración de quercetina de los extractos de *Moringa oleifera* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) obteniéndose 436.44 ± 5.22 mg/kg de quercetina en E1 (extracto con metanol) y 319.81 ± 1.98 mg/kg de quercetina en E2 (extracto con éter dietílico). En E3 (extracto con hexano) no se identificó quercetina.

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* haciendo uso del método CUPRAC, obteniéndose 318.61 mg de ácido ascórbico equivalente/kg de extracto

en E1, 303.55 mg de ácido ascórbico equivalente/kg de extracto en E2 y 266.00 mg de ácido ascórbico equivalente/kg de extracto en E3.

Existe una relación directa entre la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* con su concentración de quercetina.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, moringa, antioxidante, extracto, percolación, HPLC, quercetina, CUPRAC.



ABSTRACT

There are pathologic processes reasonably attributed to free radicals, which are involved with are involved in some of the phases or pathways of oxidative stress. Recently, the study of phytochemicals catalogs them as nutritional elements of high importance in diet incorporation, because, among its pharmacological activity, the antioxidant capacity highlights, counteracting the free radicals and inhibiting the oxidative stress development.

The objective of the present study consisted in determining the antioxidant capacity of the vegetal extracts of *Moringa oleifera* and correlate them with their quercetin content. Hence the vegetal matrix extraction was performed with the percolation continuous method, using three solvent systems: methanol, diethyl ether and hexane. The extracts were concentrated using the rotavapor and their copper reducing antioxidant capacity (CUPRAC method) was evaluated using ascorbic acid as the reference material. The quercetin concentration in the vegetal extracts was determined using high performance liquid chromatography (HPLC) and the antioxidant capacity of the *Moringa oleifera* extracts was correlated with their concentration of quercetin.

The concentration of quercetin of the *Moringa oleifera* extracts was determined using high performance liquid chromatography (HPLC), obtaining 436.44 ± 5.22 mg/kg of quercetin in E1 (extract with methanol) and 319.81 ± 1.98 mg/kg of quercetin in E2 (extract with diethyl ether). In E3 (extract with hexane) quercetin was not identified.

The antioxidant capacity of the *Moringa oleifera* extracts was evaluated with the CUPRAC method, obtaining 318.61 mg of equivalent ascorbic acid/kg of extract in E1, 303.55 mg of equivalent ascorbic acid/kg of extract in E2 and 266.00 mg of equivalent ascorbic acid/kg of extract in E3.

There is a direct relationship between the antioxidant capacity of the *Moringa oleifera* extracts with their quercetin concentration.

Key words: *Moringa oleifera*, moringa, antioxidant, extract, percolation, HPLC, quercetin, CUPRAC.



HIPÓTESIS

Dado que numerosas fuentes bibliográficas aseveran que *Moringa oleifera* posee actividad antioxidante, es posible demostrar esta propiedad a través del método CUPRAC, así como correlacionarla con su contenido de quercetina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *Moringa oleifera* “moringa” y su relación con el contenido de quercetina.

Objetivos específicos

1. Obtener extractos de *Moringa oleifera* “moringa” a partir de las hojas del espécimen vegetal mediante el método de percolación, utilizando tres solventes: metanol, éter dietílico y hexano.
2. Determinar la concentración de quercetina de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
3. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” haciendo uso del método CUPRAC.
4. Determinar la relación entre la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” con la concentración de quercetina.

LISTA DE ABREVIATURAS

E1: Extracto de *Moringa oleifera* obtenido por percolación con metanol como solvente.

E2: Extracto de *Moringa oleifera* obtenido por percolación con éter dietílico como solvente.

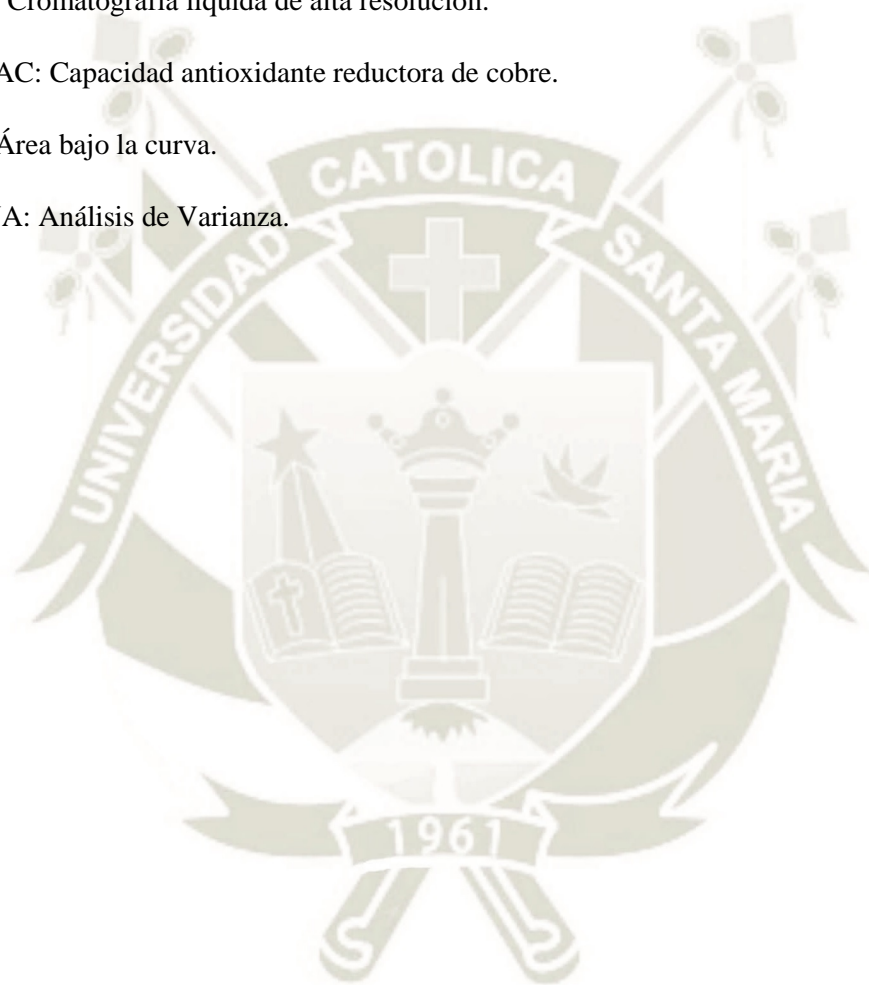
E3: Extracto de *Moringa oleifera* obtenido por percolación con hexano como solvente.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

CUPRAC: Capacidad antioxidante reductora de cobre.

AUC: Área bajo la curva.

ANOVA: Análisis de Varianza.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1. <i>Moringa oleifera</i>	2
1.1.1. CARACTERÍSTICAS.....	2
1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	2
1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	3
1.1.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	4
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO.....	5
1.3. 1EXTRACTOS VEGETALES.....	6
1.3.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	7
1.3.2. CONCENTRACIÓN.....	9
1.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	10
1.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTORA DE COBRE.....	10
CAPÍTULO II.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. MATERIALES.....	13
2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
2.1.2. MATERIAL DE VIDRIO.....	13
2.1.3. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	13
2.1.4. MATERIAL ANEXO.....	13
2.1.5. REACTIVOS.....	13
2.2. MÉTODOS.....	14
2.2.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	14
2.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	15
2.3.1. DETERMINACIÓN DE QUERCETINA.....	15
2.3.2. MÉTODO CUPRAC.....	16
CAPÍTULO III.....	17

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1. RECOLECCIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL.....	18
3.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	19
3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	23
3.3.1. DETERMINACIÓN DE QUERCETINA.....	23
3.3.2. MÉTODO CUPRAC.....	36
3.4. CORRELACIÓN ENTRE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE – QUERCETINA	40
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	43
CONCLUSIONES.....	44
SUGERENCIAS.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	51
ANEXO I Pruebas estadísticas.....	52
ANEXO II Constancia de identificación del espécimen vegetal “ <i>Moringa oleifera</i> ”.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Características morfológicas de <i>Moringa oleifera</i> . A) Hojas. B) Flores C) Árboles en un jardín botánico.....	2
Figura 1.2. Estructuras químicas. A. Quercetina. B. Ácido ascórbico Fuente: Elaboración propia (ChemDraw Ultra 12.0).....	4
Figura 1.3. Métodos extractivos convencionales ^[30]	7
Figura 1.4. Arreglo experimental de la extracción por soxhlet ^[55]	8
Figura 1.5. Arreglo experimental de la extracción por percolación	9
Figura 1.6. Reacción de CUPRAC con un antioxidante.	11
Figura 3.1. Muestra de <i>Moringa oleifera</i> recolectada en la ciudad de Camaná.....	18
Figura 3.2. Arreglo experimental de la extracción por percolación	19
Figura 3.3. Termoestabilidad del ácido ascórbico según <i>Oey et al.</i> ^[39]	20
Figura 3.4. Arreglo experimental de la concentración por rotavapor.....	21
Figura 3.5. Extractos concentrados de <i>Moringa oleifera</i>	23
Figura 3.6. Espectro de absorción de la quercetina	24
Figura 3.7. Cromatogramas de los estándares de quercetina superpuestos.	25
Figura 3.8. Gráfico de calibración de quercetina por HPLC	26
Figura 3.9. Cromatogramas de los extractos de <i>Moringa oleifera</i> . En verde: E1. En celeste: E2. En marrón: E3.	32
Figura 3.10. Reacción de hidrólisis de quercetina.....	33
Figura 3.11. Arreglo experimental de la hidrólisis de extractos de <i>Moringa oleifera</i>	34
Figura 3.12. Cromatogramas de los extractos hidrolizados de <i>Moringa oleifera</i> . En verde: E1. En celeste: E2. En marrón: E3.	35
Figura 3.13. Gráfico de calibración de la capacidad antioxidante por CUPRAC	37
Figura 3.14. Capacidad antioxidante por el método CUPRAC. A. Estándares de ácido ascórbico. B. Muestras de <i>Moringa oleifera</i> diluidas.....	38

Figura 3.15. Correlación entre la concentración de quercetina y la capacidad antioxidante de *Moringa oleifera* 42

Figura 3.16. Comparación de la Capacidad Antioxidante de los tres extractos. 56



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de <i>Moringa oleifera</i>	2
Tabla 1.2. Composición química de las hojas de <i>Moringa oleifera</i> (en 100 g).....	3
Tabla 1.3. Fracción proteica de las hojas de <i>Moringa oleifera</i> (en g /16g N).....	3
Tabla 3.1. Características de la percolación de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	20
Tabla 3.2. Rendimiento de extracción de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	21
Tabla 3.3. Características organolépticas de los extractos de <i>Moringa oleifera</i>	22
Tabla 3.4. Calibración de cinco puntos con estándares de quercetina	26
Tabla 3.5. Precisión esperada (repetibilidad) en función de concentración de analito ^[56] ..	29
Tabla 3.6. Resultados del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación(LOQ).....	31
Tabla 3.7. Área bajo la curva (AUC) de los picos de quercetina en los extractos hidrolizados de <i>Moringa oleifera</i>	35
Tabla 3.8. Concentración de quercetina (mg/Kg).....	36
Tabla 3.9. Calibración de cinco puntos con estándares de ácido ascórbico	37
Tabla 3.10. Absorbancias de los extractos diluidos de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	39
Tabla 3.11. Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	40
Tabla 3.12. Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de quercetina	41
Tabla 3.13. Concentración de quercetina en cada uno de los extractos.	52
Tabla 3.14. Prueba F para varianzas entre dos grupos	52
Tabla 3.15. Prueba t de student para muestras de varianzas iguales	53
Tabla 3.16. Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	53
Tabla 3.17. Análisis de Varianza de una vía (ANOVA)	54
Tabla 3.18. Test de Scheffe	55
Tabla 3.19. Test de Tukey	56



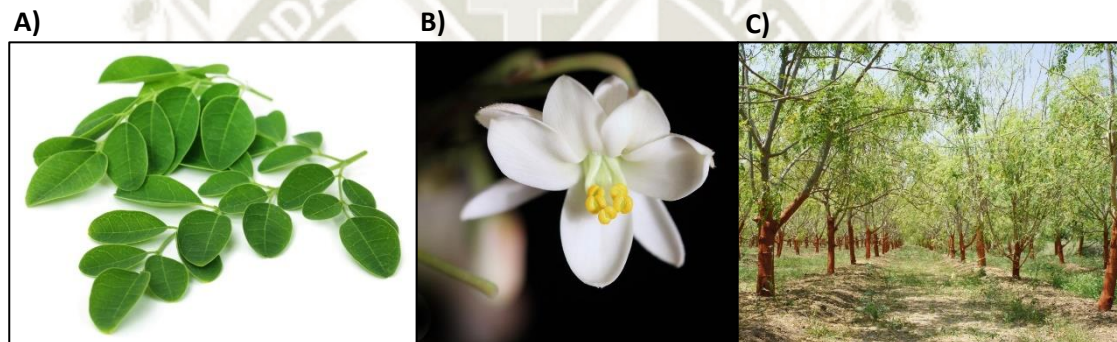
CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Moringa oleifera*

1.1.1. CARACTERÍSTICAS

Corresponde a la especie más conocida de la familia monogenérica *Moringaceae*. El árbol de la moringa es nativo del noroeste de la India, su altura promedio oscila entre los 5 y 10 metros. Su corteza es agrietada y glabra. Presenta raíces tuberosas. Las hojas tienen una longitud entre 25 y 45 centímetros, muy pobladas al final de las ramas, Las flores son fragantes, oblicuas, las panículas tienen muchas flores. Las semillas son numerosas, globulares, miden alrededor de 1 centímetro de diámetro. En la Figura 1.1 se muestran las hojas, flores y árboles de *Moringa oleifera*.^[1-6]



**Figura 1.1. Características morfológicas de *Moringa oleifera*. A) Hojas. B) Flores
C) Árboles en un jardín botánico**

1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de *Moringa oleifera* “moringa” descrito por el departamento de botánica de los Estados Unidos se presenta en la Tabla 1.1, ver Anexo II.^[7]

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de *Moringa oleifera*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Capparales</i>
Familia	<i>Moringaceae</i>
Género	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Moringa oleifera</i>

1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La Tabla 1.2 presenta los componentes de las hojas de *Moringa oleifera* estudiados por Aykroyd y colaboradores. [8-9]

Tabla 1.2. Composición química de las hojas de *Moringa oleifera* (en 100 g)

Humedad	75 %	Fósforo	70.0 mg
Proteínas	6.7 g	Potasio	259 mg
Grasa	1.7 g	Cobre	0.01 mg
Carbohidratos	13.4 g	Hierro	7.00 mg
Minerales	2.3 g	Azufre	137 mg
Fibra	0.9 g	Vitamina A	11300 U.I.
Calorías	92.0	Colina	423 mg
Calcio	440 mg	Tiamina	0.06 mg
Magnesio	24 mg	Riboflavina	0.05 mg
Ácido oxálico	101 mg	Ácido nicotínico	0.80 mg
Fósforo	70 mg	Vitamina C	220 mg

El Consejo de Investigación Científica e Industrial estudió la fracción de aminoácidos que componen las proteínas de las hojas de *Moringa oleifera*, presentándose en la Tabla 1.3. [8]

Tabla 1.3. Fracción proteica de las hojas de *Moringa oleifera* (en g /16g N)

Arginina	6.0 g
Histidina	2.1 g
Lisina	4.3 g
Triptófano	1.9 g
Fenilalanina	6.4 g
Metionina	2.0 g
Treonina	4.9 g
Leucina	9.3 g
Isoleucina	6.3 g
Valina	7.1 g

Entre los metabolitos secundarios de *Moringa oleifera* destacan los alcaloides moringina y moringinina, flavonoides como quercetina, isoquercetina, kaempferol, ramnetina y kaempferitrina. La Figura 1.2 muestra la estructura química de la quercetina y del ácido ascórbico al ser objetos de estudio en la presente investigación. [10-13]

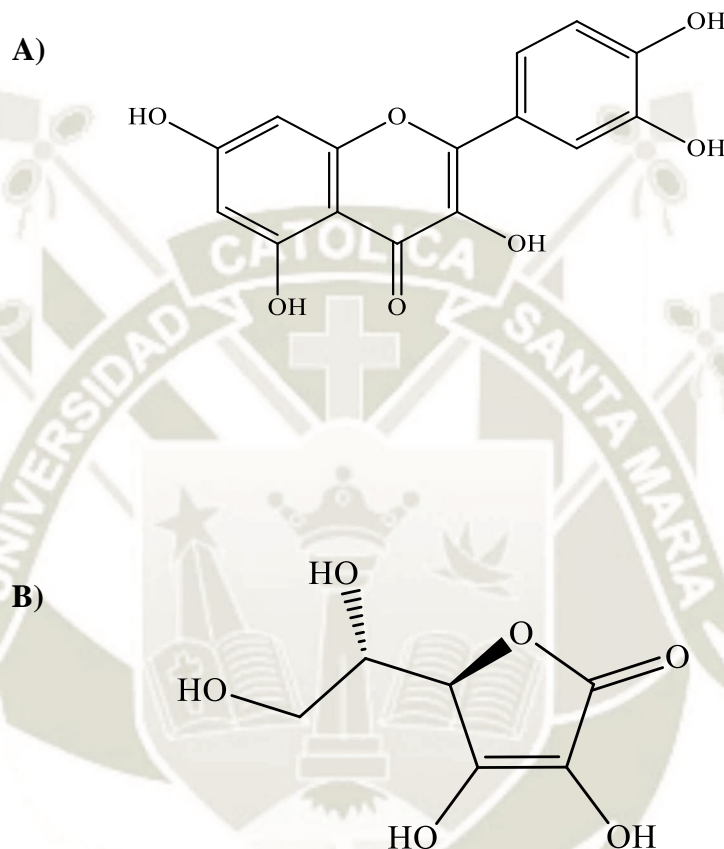


Figura 1.2. Estructuras químicas. A. Quercetina. B. Ácido ascórbico Fuente:
Elaboración propia (ChemDraw Ultra 12.0)

1.1.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Faizi y colaboradores atribuyeron efecto antihipertensivo a los tiocarbamatos y nitrilos de las hojas de *Moringa oleifera*. Este efecto se confirmó por Gilani y colaboradores al aislar compuestos puros del extracto etanólico fraccionado de *Moringa oleifera*, administrándose a ratas de experimentación hipertensas. Sugirieron como posible mecanismo de acción antihipertensiva al antagonismo de calcio. [13-16]

Pal y colaboradores estudiaron el efecto antiulceroso del extracto metanólico de hojas de *Moringa oleifera* contra lesiones gástricas inducidas en ratas. [17]

Siddhuraju y colaboradores evaluaron el efecto antioxidante de extractos acuoso, metanólico y etanólico de hojas de *Moringa oleifera*, posteriormente liofilizados, por el método de DPPH, y tras ello determinaron compuestos fenólicos de actividad antioxidante como quercetina y kaempferol mediante cromatografía líquida de alta resolución. [12]

Ghasi y colaboradores describieron el efecto hipolipemiante de los extractos crudos de *Moringa oleifera* en ratas Wistar inducidas a hipercolesterolemia con una dieta rica en grasa. [18]

Se mostró que los extractos hidroalcohólicos de frutos de *Moringa oleifera* presentan efectos positivos sobre la actividad de las enzimas metabolizadoras de fármacos, Fase I (citocromo b₅ y citocromo P₄₅₀) y Fase II (glutación-S-transferasa), enzimas antioxidantes, contenido de glutación y peroxidación lipídica, por lo que pueden ser utilizados para la prevención de carcinogénesis química. [53]

Se demostró que los extractos de las raíces de *Moringa oleifera* ayudan a la protección contra enfermedades inflamatorias, debido a que los extractos metanólicos de raíces de moringa reducen el edema inducido por carragenina en animales de experimentación [54]

1.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos que lo utilizan. Este elemento desempeña una función importante comoceptor final de electrones durante la respiración celular, pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como estrés oxidativo. [19] Si bien más del 95% del oxígeno consumido por los organismos aerobios es reducido completamente a H₂O durante la respiración mitocondrial, un pequeño porcentaje (<5%) es convertido a especies semirreducidas conocidas como especies reactivas del oxígeno. [20] El estrés oxidativo se produce por un desbalance a corto o largo plazo del equilibrio antioxidantes/pro-oxidantes que provoca disrupción de los sistemas de señalización y control a consecuencia de favorecer los procesos de pro-oxidación u obstaculizar los mecanismos antioxidantes. [21] Las especies reactivas de oxígeno son capaces de

oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que resulta en un cambio de sus estructuras y función. [22]

La mitocondria constituye la fuente generadora principal de radicales libres. Durante el proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno en más de un 95 % recibe 4 electrones para la formación de agua, pero una pequeña parte escapa a esta reducción. [23] Una consecuencia directa de este proceso es la generación del radical anión superóxido (O_2^-). Las especies reactivas de oxígeno también se pueden formar durante las acciones enzimáticas y otros procesos endógenos. [24] En este sentido se pueden citar la NADPH oxidasa de membrana, especialmente durante los procesos inflamatorios y de fagocitosis, la ciclooxigenasa en la cascada del ácido araquidónico, la xantina oxidasa en el metabolismo del ácido úrico, las óxido nítrico sintasas y la monoamino oxidasa por solo citar algunos ejemplos. [25] Cabe destacar que algunas especies reactivas de oxígeno se forman en el organismo por la acción de factores externos (ambientales, dietéticos, entre otros). Otra fuente generadora de radicales libres es la alteración estructural y funcional de las células, mediada por especies reactivas de oxígeno; estas reacciones generan derivados como el malonildialdehído e hidroperóxidos orgánicos que propagan el daño oxidativo. [24]

Existen procesos patológicos atribuibles razonablemente a los radicales libres los cuales estarían involucrados en algunas de las fases o secuencias bioquímicas de dichos procesos. [26-27] Harman desde 1954 planteaba que la expectativa de vida aumentaba con la disminución del grado de fenómenos oxidativos. [28] La relación existente entre la concentración de especies reactivas de oxígeno y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado por la comunidad científica. [29]

1.3. 1EXTRACTOS VEGETALES

Existen diversos métodos de extracción los cuales se pueden observar en la Figura 1.3, descrita por Kuklinski. [30]

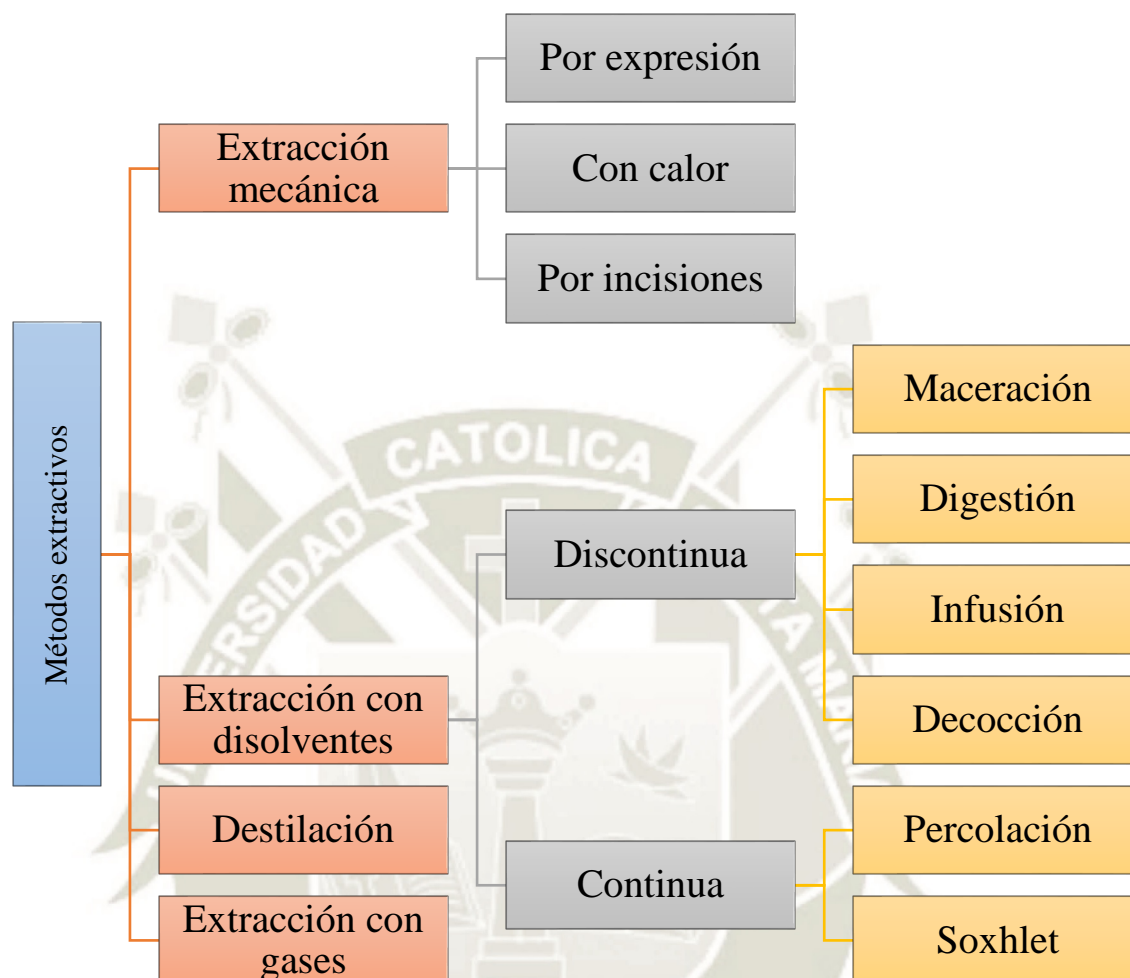


Figura 1.3. Métodos extractivos convencionales ^[30]

1.3.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Tal como se observa en la Figura 1.3, se clasifican en extracción mecánica (por expresión, calor o incisiones), mediante gases (extracción por CO₂ supercrítico), destilación (aislamiento de compuestos químicos volátiles) y extracción con disolventes. Respecto a esta última existen dos categorías: Extracción continua y discontinua. ^[30]

La extracción discontinua se fundamenta en el contacto directo y constante entre la matriz vegetal y el solvente de extracción, por lo que la difusión de los compuestos químicos afines al solvente es bidireccional hasta que haya un equilibrio entre ambas partes. ^[30]

La extracción continua, por su parte, tiene la cualidad de que el solvente se va renovando a la par que se realizan ciclos de extracción, obteniendo fracciones de los compuestos afines al solvente y llevándolas a un recipiente ajeno a la cámara de extracción propiamente. Por esta razón la difusión de los compuestos químicos es unidireccional, obteniéndose un mayor rendimiento de extracción que con un método de extracción discontinuo. [30]

1.3.1.1. SOXHLET

Corresponde a uno de los métodos de extracción continua con disolventes, como se muestra en la Figura 1.4. El componente principal de este tipo de extracción es el calor, pues este facilitará la separación del extracto obtenido en cada ciclo de extracción para renovar el solvente y dirigirse nuevamente a la cámara de extracción. [30]

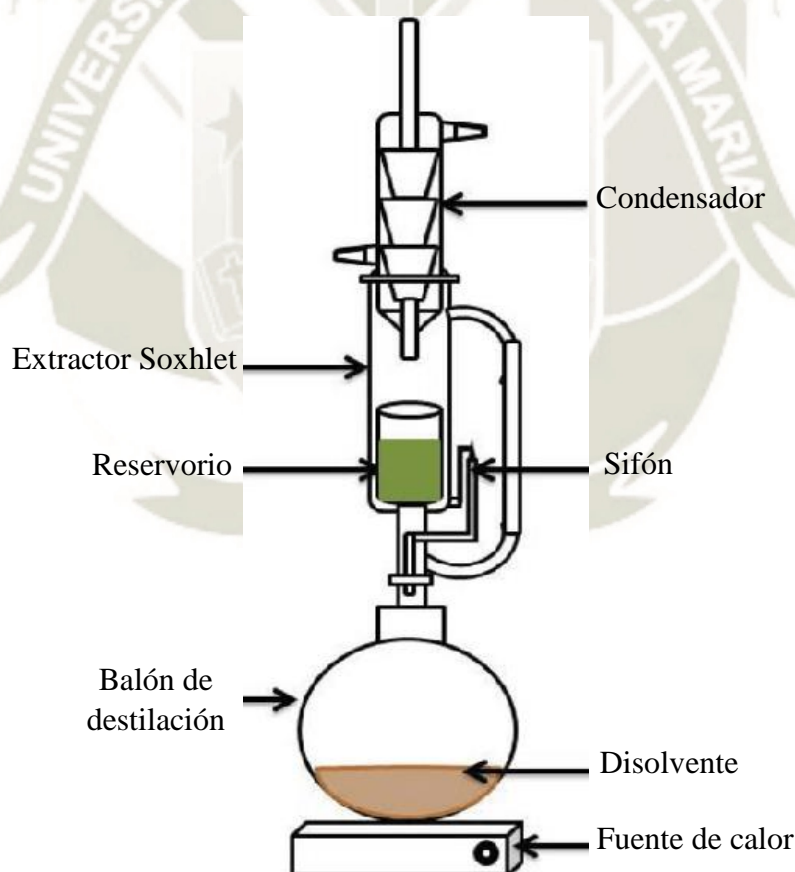


Figura 1.4. Arreglo experimental de la extracción por soxhlet [55]

1.3.1.2. PERCOLACIÓN

También conocida como lixiviación, es el segundo método de extracción continua con disolventes. La ventaja de este sistema respecto a la extracción

Soxhlet es que no requiere de la aplicación de calor, por lo que este método no afecta a las sustancias químicas termolábiles (capaces de hidrolizarse o degradarse mediante calor), siendo el método de elección para el desarrollo de la presente investigación. El arreglo experimental, mostrado en la Figura 1.5, contempla que el extracto debe drenarse del sistema a una velocidad de goteo de 60 gotas/minuto. Este a su vez debe verterse mecánicamente a la parte superior del sistema percolador y repetir el proceso hasta extraer los componentes químicos afines de la matriz vegetal. [30-31]

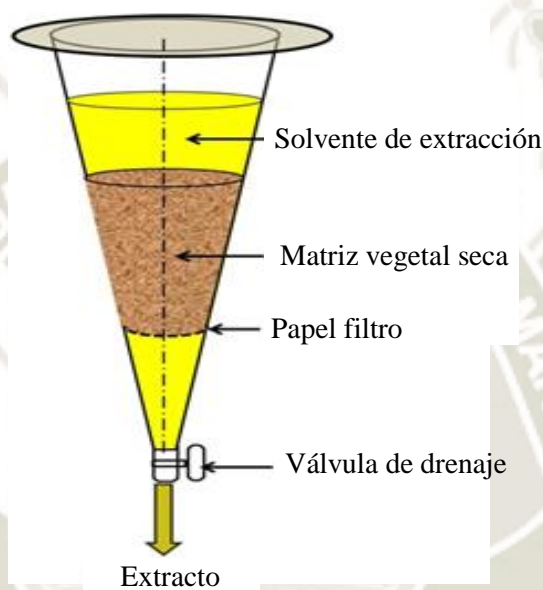


Figura 1.5. Arreglo experimental de la extracción por percolación

1.3.2. CONCENTRACIÓN

Consiste en separar el solvente de los compuestos químicos arrastrados por este durante la extracción, con el fin de evitar posibles interferencias en futuros experimentos y determinar el rendimiento de extracción. Dependiendo del solvente utilizado puede utilizarse una concentración al vacío o liofilización. [30]

1.3.2.1. AL VACÍO

En el caso de no utilizar al agua como solvente de extracción se utiliza el rotavapor o evaporador rotatorio, caracterizado por utilizar temperaturas cercanas al punto de ebullición del solvente para separarlo de los componentes químicos de la especie vegetal. Para disminuir el punto de ebullición suele utilizarse un sistema de vacío, reduciendo la posibilidad de afectar a las sustancias termolábiles del sistema. [32]

1.3.2.2. LIOFILIZACIÓN

De tratarse de extractos acuosos, se recomienda liofilizarlos para su concentración, lo cual consiste en reducir la presión del sistema mediante aplicación de vacío y tras ello realizar una rampa o cambio gradual de bajas a elevadas temperaturas, consiguiendo que el solvente pase del estado físico sólido a gas directamente sin pasar por el líquido (sublimación). [33]

1.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Es un método de separación de sustancias químicas de acuerdo a su polaridad o afinidad por una fase estacionaria sólida (columna cromatográfica) y una fase móvil líquida (a menudo compuesta por varios solventes distribuidos en varios canales). Al acoplarse a un sistema detector, como el arreglo de diodos, puede cumplir también la función de realizar análisis cuantitativo de tales sustancias separadas. Es requisito indispensable para el detector de arreglo de diodos que las moléculas en estudio posean dobles enlaces en su estructura química, de tal modo que absorban luz en el rango ultravioleta-visible para su óptima detección. Los cromatogramas representan una relación absorbancia vs. tiempo de elución, indicando por cada pico en el gráfico a una sustancia química de polaridad específica. Para el análisis cuantitativo se requiere integrar las áreas bajo la curva de los picos de interés y relacionar tales áreas con la concentración del analito en estudio, considerando estándares de concentración conocida del analito para el desarrollo de un gráfico de calibración y las muestras de concentración conocida a interpolarse en la ecuación de regresión lineal calculada. [34-38]

1.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE REDUCTORA DE COBRE

Su fundamento se basa en la formación de compuesto cromógeno de Cu (II) con neocuproína a un pH 7 dado por el buffer acetato de amonio que, al entrar en contacto con el antioxidante, este compuesto cromógeno se reduce a Cu (I) con neocuproína, lo que le brinda el color amarillo anaranjado como se muestra en la Figura 1.6. La absorbancia del cromógeno Cu (I) se mide a 450 nm y la reacción de CUPRAC se observa dentro de los 30 minutos. [51-52]

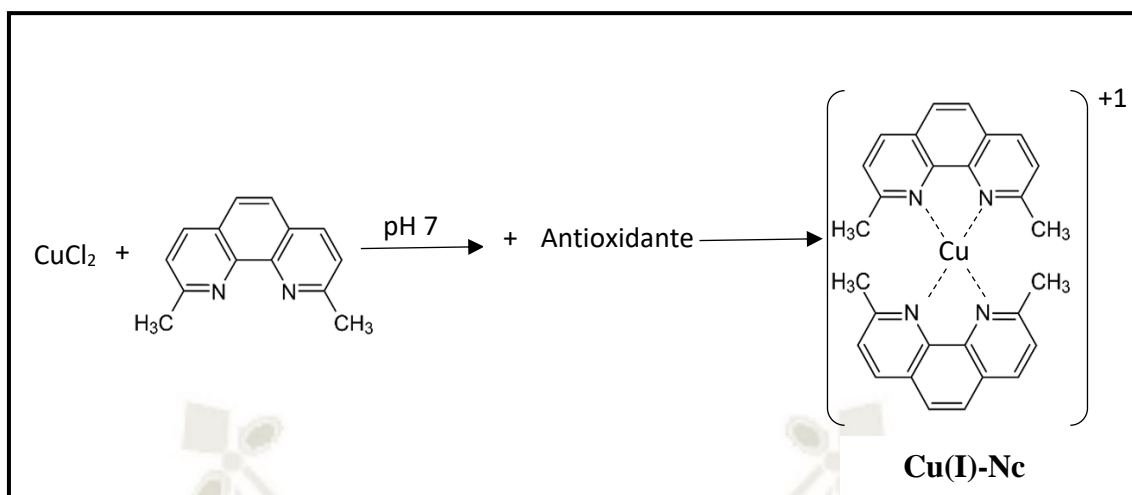


Figura 1.6. Reacción de CUPRAC con un antioxidante.

Fuente: Elaboración propia (ChemDraw Ultra 12.0)



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Hojas de *Moringa oleifera* recolectadas en la ciudad de Camaná.

2.1.2. MATERIAL DE VIDRIO

- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Beakers de 100, 250 y 500 mL
- Tubos de ensayo
- Fiolas de 25, 50 y 100 mL
- Viales de inyección para HPLC
- Bureta de 25 mL

2.1.3. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica (Marca OHAUS® Modelo DV215CD)
- Rotavapor Buchi
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (Marca HITACHI Modelo ELITE LaChrom)
- Sistema de filtración de fases móviles para HPLC
- Micropipeta P1000

2.1.4. MATERIAL ANEXO

- Tips o puntas para micropipeta P1000
- Tamiz de 850 μm de diámetro de poro

2.1.5. REACTIVOS

- Metanol (grado HPLC, MERCK)
- Éter dietílico (grado P.A., MERCK)
- Hexano (grado P.A., J.T. Baker)
- Quercetina (95%, grado HPLC, Sigma-Aldrich)
- Ácido ortofosfórico 85%
- Cloruro de cobre
- Acetato de amonio
- Neocuproína

- Etanol 96% (DIPROQUIM)
- Agua ultrapura

2.2. MÉTODOS

2.2.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.2.1.1. RECOLECCIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL

Se obtuvo tallos y hojas de *Moringa oleifera* de la ciudad de Camaná. Se transportó el material vegetal al departamento de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa para su identificación botánica. Se dejó secar el material vegetal en oscuridad a temperatura ambiente durante dos semanas. Se separó las hojas del resto de la planta y se realizó un proceso de molienda en una licuadora doméstica. El material vegetal fue posteriormente tamizado a través de un tamiz de 850 μm de diámetro de poro.

2.2.1.2. EXTRACCIÓN

El método de extracción utilizado para obtener los compuestos activos de *Moringa oleifera* fue por percolación. El arreglo experimental del mismo consistió en una bureta de 500 mL en cuyo interior se colocó un papel filtro. Sobre este se agregó una capa de 30 g de material vegetal tamizado, posteriormente un papel filtro y enseguida un volumen de solvente equivalente al 25 % del volumen ocupado por la matriz vegetal (se usaron tres solventes: metanol, éter dietílico y hexano para los extractos E1, E2 y E3, respectivamente). Tras el contacto entre la matriz y el solvente durante 72 horas, se drenó cada extracto por goteo a un flujo de 60 gotas por minuto. Se agregó solvente por la parte superior de la bureta para que el sistema de extracción sea continuo. Esto fue realizado varias veces hasta obtener un volumen final de 300 mL de extracto. Los extractos obtenidos fueron conservados en frascos ámbar a 4 °C para su posterior concentración.

2.2.1.3. CONCENTRACIÓN

Los extractos fueron concentrados en un rotavapor Buchi. Se utilizó una bomba Venturi como fuente de vacío. Cada extracto fue transferido a un balón de concentración (previamente pesado) y se procedió a evaporar el solvente de extracción. Al término del proceso se secó y se pesó cada balón

nuevamente, con la finalidad de obtener el porcentaje de rendimiento de extracción, como se muestra en la Ecuación 2.1. El residuo de cada balón fue transferido a tubos de microcentrífuga para experimentos posteriores.

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = 100 \times \frac{\text{Balón con residuo} - \text{Balón vacío}}{\text{Muestra}}$$

Ecuación 2.1. Cálculo del porcentaje de rendimiento de extracción

2.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.3.1. DETERMINACIÓN DE QUERCETINA

Se instaló una columna de fase reversa RP-18. Se preparó fase móvil en diferentes canales: metanol y agua ultrapura acidificada con ácido ortofosfórico al 0.08 %. Se filtró cada solvente a través de una membrana de 0.2 μm de diámetro de poro. Se encendió el equipo y sus componentes. Tras verificar su óptimo funcionamiento, se purgó los canales a usar. Se evaluó las condiciones cromatográficas (flujo de fase móvil, volumen de inyección, tiempo de corrida, temperatura del horno, longitud de onda y detector) de acuerdo a estudios preexistentes, adaptando la técnica al equipo con que se trabajará en las instalaciones de la universidad.

2.3.1.1. GRÁFICA DE CALIBRACIÓN HPLC

En una fiola de 25 mL se pesó 12.5 mg de quercetina grado HPLC, se disolvió y enrasó con metanol grado HPLC, siendo esta la solución stock de 500 ppm de quercetina. En fiolas de 25 mL se transfirió 0.25/1.25/1.5/3/6 mL del contenido del stock de 500 ppm y se enrasó con metanol grado HPLC. La concentración de los estándares fue de 5/25/30/60/120 ppm de quercetina. Se filtró cada estándar hacia un vial de inyección a través de una membrana de 0.2 μm de diámetro de poro.

2.3.1.2. TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA HPLC

En tubos de microcentrífuga se pesó 100 mg de cada extracto, se llevó a volumen final de 1 mL con metanol grado HPLC y se llevó a baño de ultrasonido durante 5 minutos. Se filtró cada muestra sobre viales de inyección a través de una membrana de 0.2 μm de diámetro de poro. Se insertó los viales en el equipo autosampler junto a los estándares. Se corrió la

secuencia programada con las condiciones cromatográficas y se obtuvo cromatogramas para integrar las áreas bajo la curva, calculando la concentración de quercetina de los extractos de *Moringa oleifera*.

2.3.2. MÉTODO CUPRAC

Tanto los estándares para la curva de calibración como el tratamiento de muestras requirieron de la preparación de tres soluciones reactivas descritas a continuación:

Rx 1) Cloruro cúprico dihidratado 0.02 M (250 mL de solución contienen 0.4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, enrasar con agua destilada).

Rx 2) Buffer acetato de amonio 1 M pH 7.0 (250 mL de solución contienen 19.27 g de acetato de amonio, enrasar con agua destilada).

Rx 3) Neocuproína 0.0075 M (25 mL de solución contienen 0.039 g de neocuproína, enrasar con etanol al 96 %, estable por un día).

2.3.2.1. GRÁFICA DE CALIBRACIÓN CUPRAC

Se preparó una solución stock pesando 0.5 g de ácido ascórbico, se transfirió a una fiola de un litro y se enrasó con etanol al 96 % (500 ppm). Se preparó 5 estándares y un blanco de etanol en fiolas de 100 mL transfiriendo del stock a través de una bureta: 1/2/3/4/5 mL, enrasando con etanol. En tubos de ensayo se mezcló 1 mL de Rx 1) + 1 mL de Rx 2) + 1 mL de Rx 3) + 0.5 mL de estándar + 0.5 mL de agua ultrapura. Se agitó y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a $\lambda = 450$ nm. Se generó una ecuación de regresión lineal, considerando las concentraciones de los estándares: 0.625/1.25/1.875/2.5/3.125 mg/L de ácido ascórbico.

2.3.2.2. TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA CUPRAC

Se preparó diluciones seriadas del extracto vegetal en base 10. En tubos de ensayo se mezcló 1 mL de Rx 1) + 1 mL de Rx 2) + 1 mL de Rx 3) + 0.5 mL de muestra + 0.5 mL de agua ultrapura. Se agitó y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a $\lambda = 450$ nm y se obtuvo la capacidad antioxidante a partir de las partes por millón directamente interpoladas (ppm ácido ascórbico).



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RECOLECCIÓN DEL ESPÉCIMEN VEGETAL

Se recolectó tallos y hojas de *Moringa oleifera* en la ciudad de Camaná en el mes de abril del 2018, siendo la estación de otoño. Las condiciones durante la recolección incluyeron: Clima templado y planta provista de luz y sombra durante el día.

La planta fue entonces transportada al departamento de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, obteniéndose la constancia que verifica la autenticidad del espécimen recolectado y que se muestra en el Anexo II. Posteriormente se dejó secar la planta a temperatura ambiente y en oscuridad durante 14 días. Se escogió las hojas secas de *Moringa oleifera* y se procedió a triturar la planta en una licuadora doméstica, para luego ser tamizada en un tamiz de 850 μm de diámetro de poro. La muestra del espécimen vegetal recolectado se presenta en la Figura 3.1.



Figura 3.1. Muestra de *Moringa oleifera* recolectada en la ciudad de Camaná

3.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La muestra de *Moringa oleifera* tamizada fue sometida a un proceso de extracción continua por el método de percolación. Se pesó una cantidad de planta (datos presentados en la Tabla 3.1), se transfirió esta masa a una bureta de 500 mL en cuyo fondo se colocó papel filtro. Sobre la masa de *Moringa oleifera* se colocó una capa adicional de papel filtro y sobre esta se agregó un solvente de extracción (correspondiente al extracto E1, E2 o E3), cuyo volumen equivalió a la cuarta parte del volumen ocupado por la matriz vegetal. Se dejó el sistema en reposo y se procedió a abrir la llave de drenaje a un flujo de 60 gotas por minuto, recibiendo el extracto en un frasco de vidrio ámbar. Al término, se cerró la llave de drenaje y se agregó más solvente por la parte superior de la bureta, repitiéndose el proceso (extracción continua) hasta obtener un volumen final óptimo (datos presentados en la Tabla 3.1). El arreglo experimental de la extracción por percolación se ilustra en la Figura 3.2.

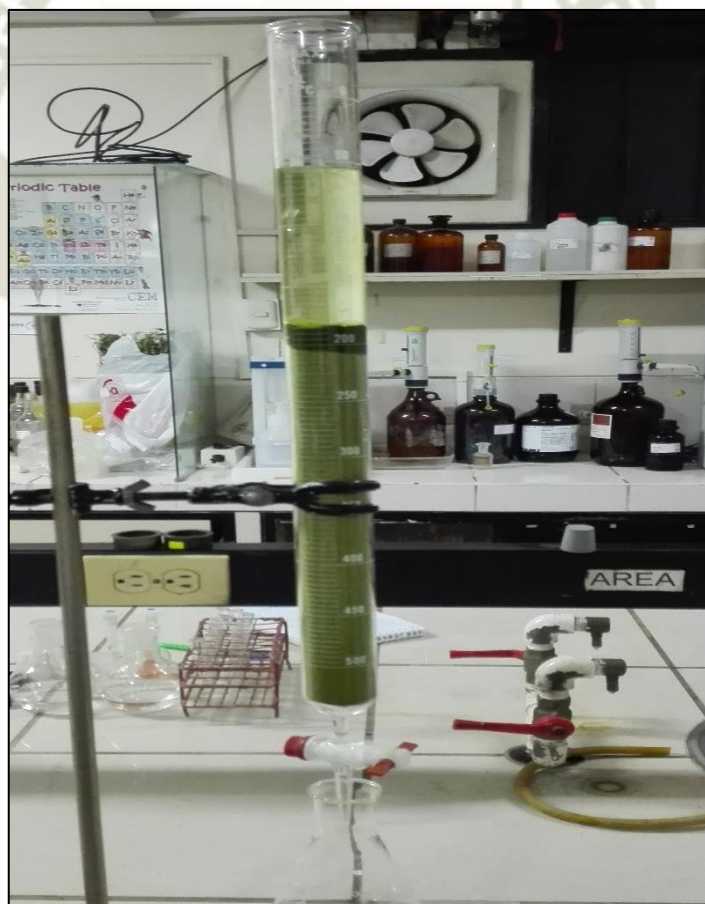


Figura 3.2. Arreglo experimental de la extracción por percolación

Tabla 3.1. Características de la percolación de hojas de *Moringa oleifera*

Extracto	Solvente	Peso de muestra	Volumen final
E1	Metanol	20.0150 g	200 mL
E2	Éter dietílico	30.0182 g	300 mL
E3	Hexano	30.0104 g	300 mL

Fuente: Elaboración propia

Los extractos vegetales fueron posteriormente concentrados en el rotavapor o evaporador rotatorio. Dado que este proceso requiere de la aplicación de temperatura al sistema y, por otro lado, se proyectó estudiar la capacidad antioxidante de los extractos vegetales concentrados en relación a su contenido de ácido ascórbico, se realizó un estudio bibliográfico sobre la termoestabilidad del ácido ascórbico. Oey y colaboradores estudiaron la estabilidad del ácido ascórbico (AA) a la temperatura, determinando su concentración mediante HPLC luego del tratamiento térmico. Se observó, según la Figura 3.3, que hasta los 60 °C no hay pérdida importante de ácido ascórbico. [39-44]

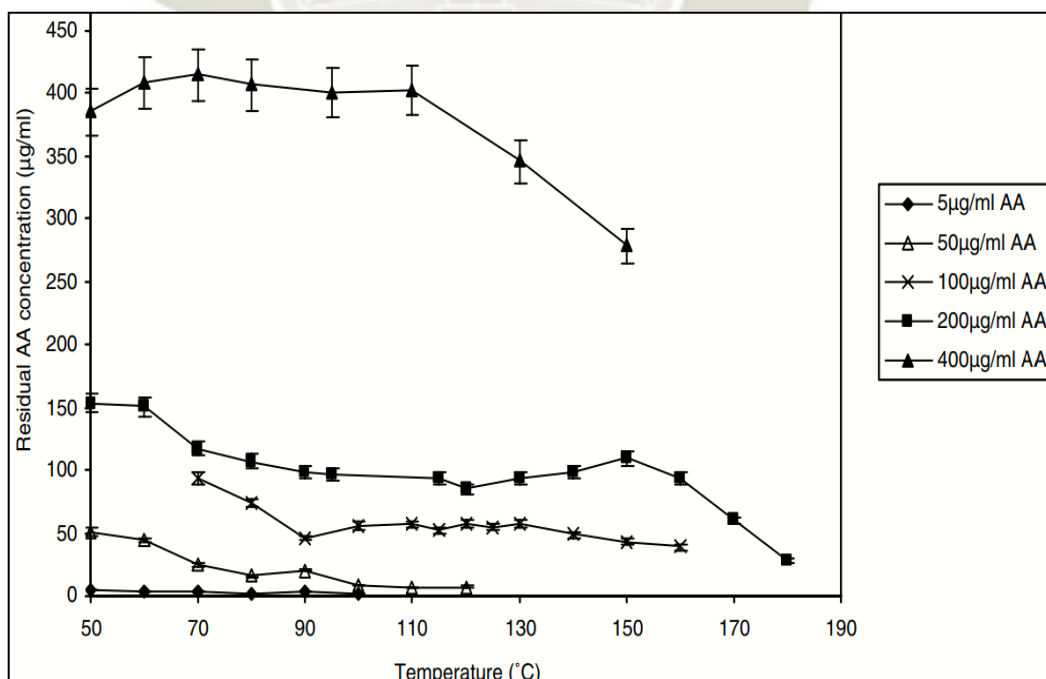


Figura 3.3. Termoestabilidad del ácido ascórbico según Oey et al. [39]

La temperatura del Baño María utilizada en el rotavapor no excedió los 50 °C para prevenir la degradación del ácido ascórbico contenido en los extractos de *Moringa oleifera*. La Figura 3.4 muestra el arreglo experimental de la concentración de los extractos de *Moringa oleifera* por rotavapor.



Figura 3.4. Arreglo experimental de la concentración por rotavapor

El porcentaje de rendimiento de cada extracción se obtuvo considerando el peso de la muestra colocada en el sistema de percolación, el peso del balón del rotavapor antes de agregar el líquido extractivo (balón vacío) y después de haber concentrado cada extracto (balón con residuo). El cálculo del porcentaje de rendimiento de extracción se realizó mediante la Ecuación 2.1. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Rendimiento de extracción de hojas de *Moringa oleifera*

Extracto	Peso de muestra	Peso de balón vacío	Peso de balón con residuo	Rendimiento de extracción
E1	20.0150 g	70.4473 g	73.3430 g	14.47 %
E2	30.0182 g	81.5440 g	83.0845 g	5.13 %
E3	30.0104 g	80.2450 g	81.5750 g	4.43 %

Fuente: Elaboración propia

Por su parte, Vongsak y colaboradores obtuvieron rendimientos de extracción del 32.75 % y 34.47 % al realizar percolación con hojas de *Moringa oleifera* utilizando como solventes etanol al 70 % y etanol al 50 %, respectivamente. ^[45]

Cabe mencionar que el porcentaje de rendimiento de extracción en cada uno de los tres extractos obtenidos muestra diferencia, como se observa en la Tabla 3.2., debido a que cada solvente empleado es de una

polaridad distinta y eso conlleva a una afinidad de ciertas sustancias por determinado solvente. En el caso del E1 (Extracto con metanol como solvente) se observa un porcentaje de rendimiento mayor al de E2 (Extracto con éter dietílico como solvente) y E3 (extracto con hexano como solvente) debido a que existe una prioridad de las sustancias solubles en dicho solvente.

Sin embargo, Pal y colaboradores

obtuvieron extractos de hojas de *Moringa oleifera* con el método de Soxhlet y el rendimiento de extracción fue de 8 % al utilizar éter de petróleo como solvente. ^[46]

Las características organolépticas de los extractos concentrados y transferidos a tubos de microcentrífuga (Figura 3.5) se describen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características organolépticas de los extractos de *Moringa oleifera*

Extracto	Color	Olor	Aspecto
E1	Verde oscuro	<i>Sui generis</i>	Fluido
E2	Verde oscuro	<i>Sui generis</i>	Pastoso
E3	Verde oscuro	<i>Sui generis</i>	Pastoso

Fuente: Elaboración propia

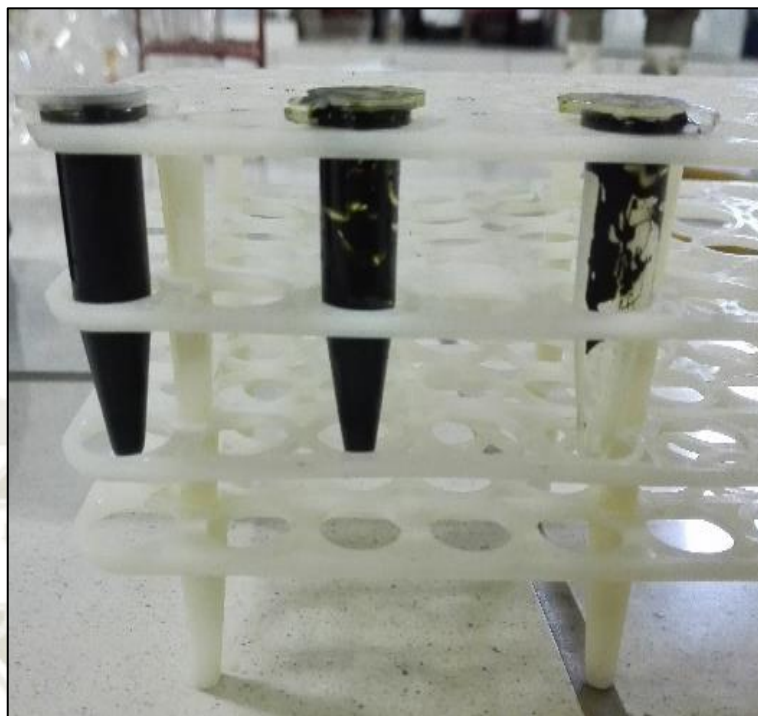


Figura 3.5. Extractos concentrados de *Moringa oleifera*

3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.3.1. DETERMINACIÓN DE QUERCETINA

3.3.1.1. GRÁFICA DE CALIBRACIÓN HPLC

Se preparó estándares por cuadruplicado para la gráfica de calibración de cinco puntos de la siguiente manera: En una fiola de 25 mL se pesó 12.5 mg de quercetina grado HPLC, se disolvió y enrasó con metanol grado HPLC, siendo esta la solución stock de 500 ppm de quercetina. En fiolas de 25 mL se transfirió 0.25/1.25/1.5/3/6 mL del contenido del stock de 500 ppm y se enrasó con metanol grado HPLC. La concentración de los estándares fue de 5/25/30/60/120 ppm de quercetina. Se filtró cada estándar hacia un vial de inyección a través de una membrana de 0.2 μm de diámetro de poro.

Las condiciones cromatográficas elegidas para el desarrollo de la técnica analítica fueron: Columna de fase reversa RP-18, fase móvil isocrática (constante durante el tiempo de corrida) compuesta por: metanol y agua acidificada con ácido ortofosfórico al 0.08% en proporciones 50:50. Rango de longitud de onda de adquisición: 300-400 nm. Tiempo de corrida: 10 minutos. Volumen de inyección: 10 μL . Temperatura del horno: 25 °C.

Para elegir la longitud de onda óptima de análisis de datos se realizó un espectro de absorción entre 300 y 400 nm con el estándar de mayor concentración (120 ppm de quercetina), obteniéndose que, a los 370 nm de longitud de onda, el pico de absorción es más alto, por lo que la sensibilidad de detección de quercetina aumentaría al trabajar con tal longitud de onda. El espectro de absorbancia vs. Longitud de onda vs. Tiempo de retención se muestra en la Figura 3.6.

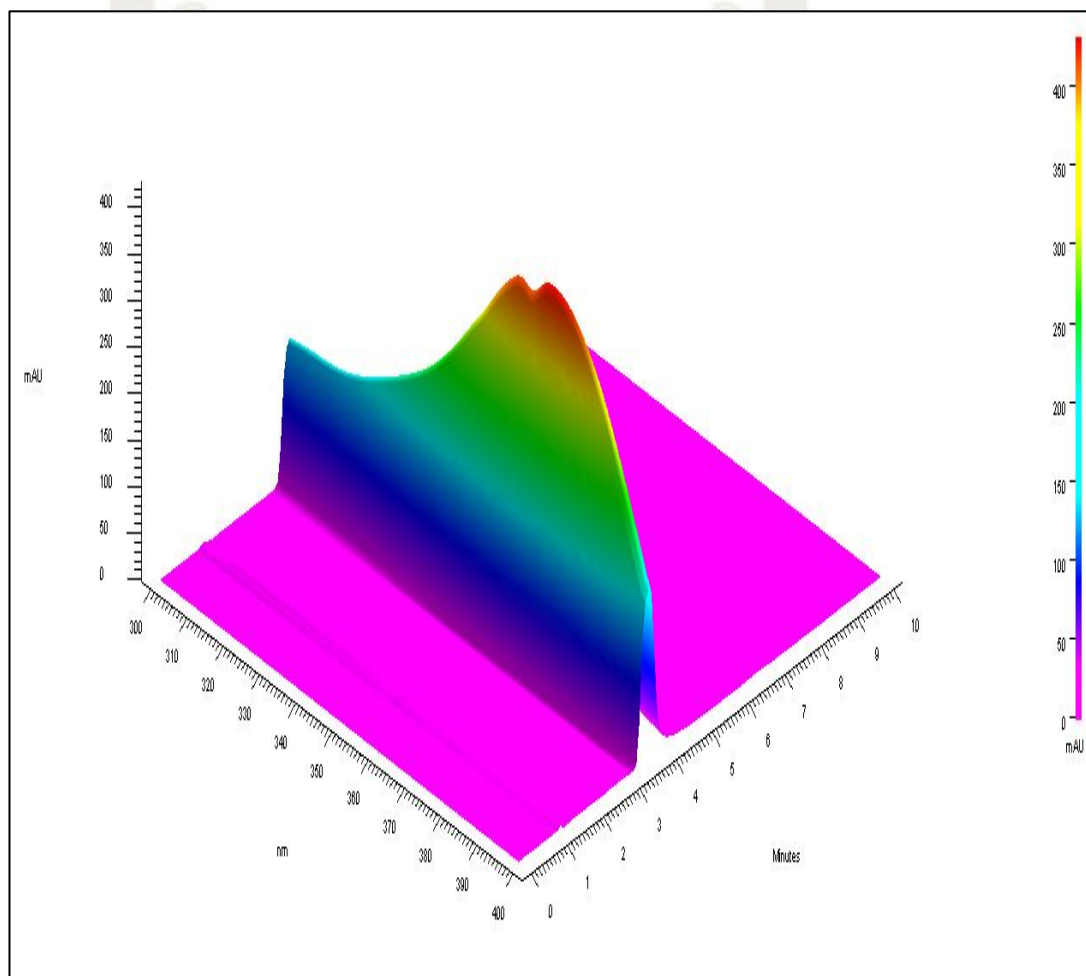


Figura 3.6. Espectro de absorción de la quercetina

Se programó una secuencia de eventos en el software EZChrom Elite con las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. De este modo se obtuvo un cromatograma por cada estándar. Los cinco cromatogramas fueron superpuestos y se presentan en la Figura 3.7.

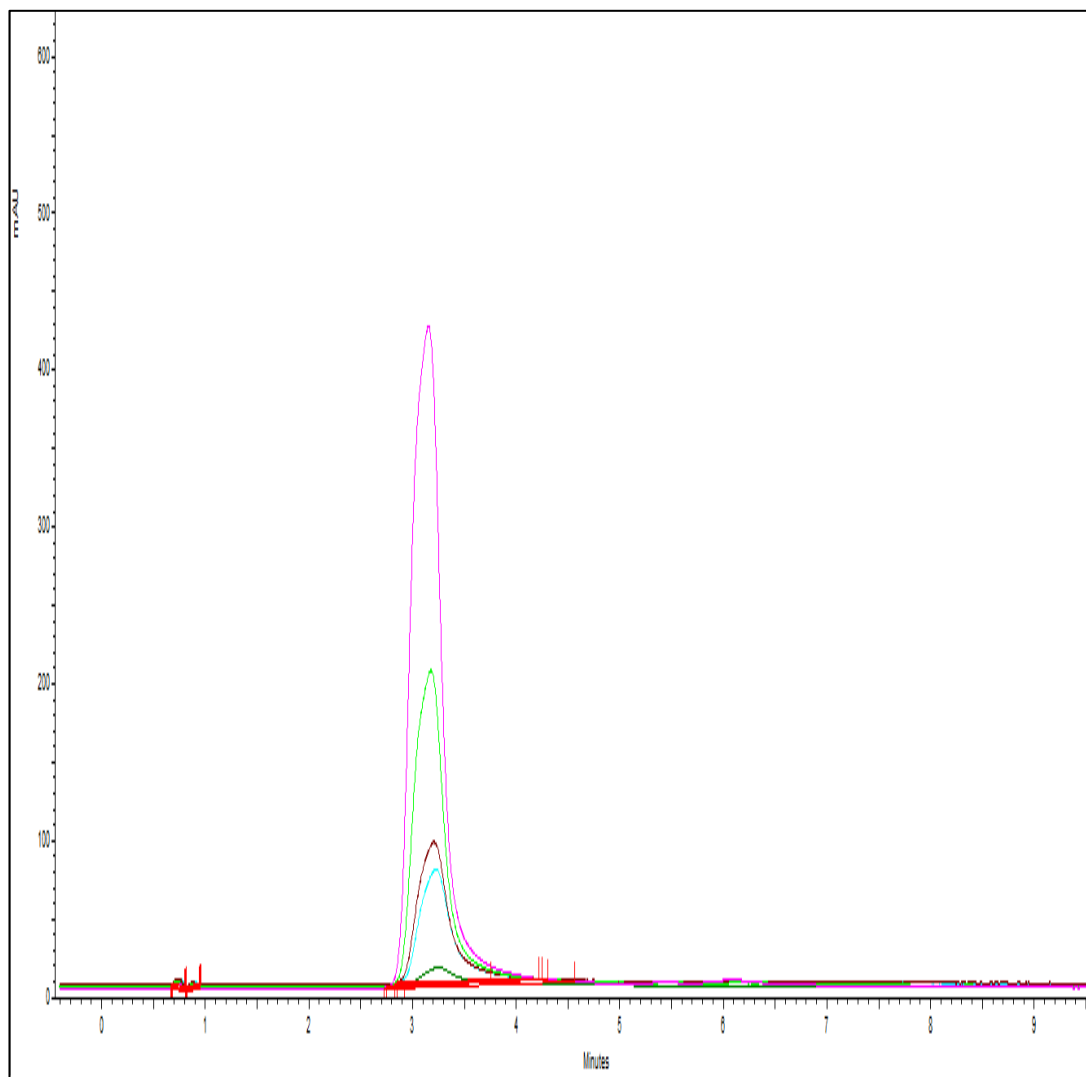


Figura 3.7. Cromatogramas de los estándares de quercetina superpuestos.

En fucsia: 120 ppm. En verde claro: 60 ppm. En marrón: 30 ppm. En celeste: 25 ppm. En verde oscuro: 5 ppm

Se integró las áreas bajo la curva de cada pico y se realizó un análisis de regresión lineal con respecto a los estándares de quercetina en referencia al promedio de las áreas obtenidas tras cuatro réplicas del experimento: área promedio vs. concentración. Los datos se presentan en la Tabla 3.4. El gráfico de calibración correspondiente se muestra en la Figura 3.8.

Tabla 3.4. Calibración de cinco puntos con estándares de quercetina

Concentración	Área bajo la curva				Área Promedio	St. Dev.	C.V.%
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4			
5 ppm	888804	914650	1103128	1166550	1018283	137460.7671	13.50%
25 ppm	6247790	6186365	6247380	6216338	6224468.25	29364.4396	0.47%
30 ppm	7559257	7638644	8257244	8219732	7918719.25	370973.0165	4.68%
60 ppm	16805759	16717286	17320264	17339638	17045736.75	330258.6721	1.94%
120 ppm	34339971	34887393	35980424	35675898	35220921.5	746360.6605	2.12%

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

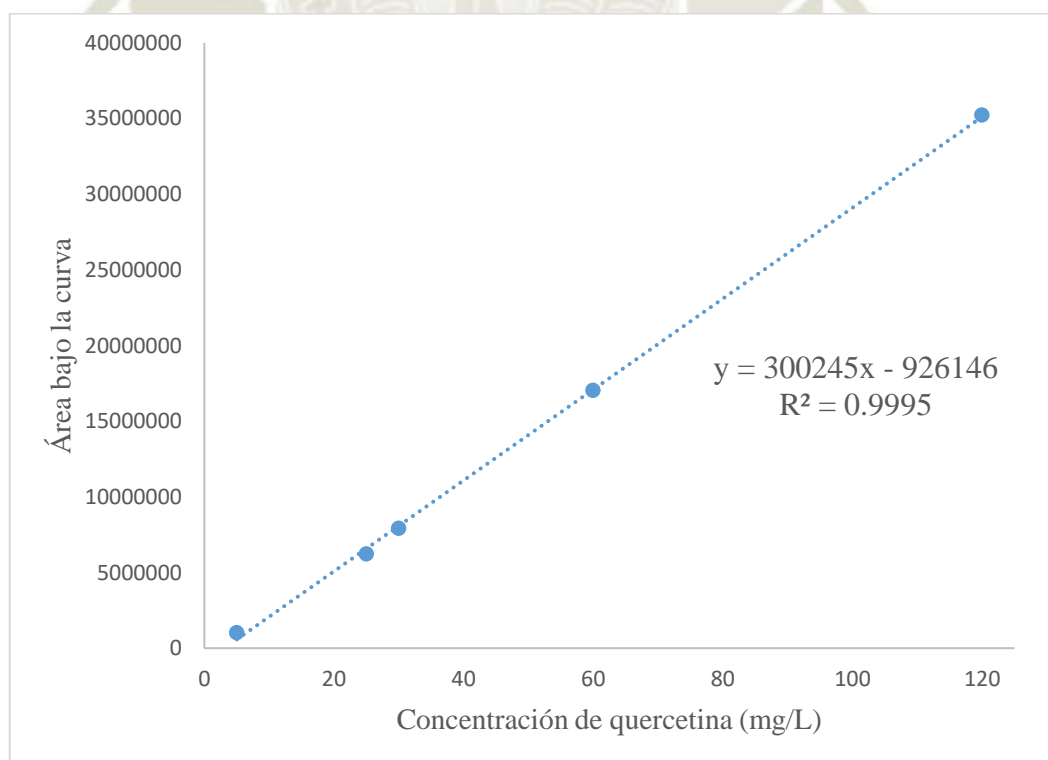


Figura 3.8. Gráfico de calibración de quercetina por HPLC

3.3.1.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

El proceso de validación nos permite que mediante estudios en laboratorio podamos determinar si nuestro método es fiable, por lo cual se determinó tres parámetros de validación (linealidad, precisión y sensibilidad) para la técnica analítica desarrollada para cuantificar quercetina en hojas de *Moringa oleifera*.

3.3.1.2.1. LINEALIDAD

La linealidad es un parámetro que nos permite conseguir resultados que sean proporcionales a la cantidad del analito en nuestra muestra por ello se establece que, para que una técnica analítica por HPLC sea lineal, el coeficiente de determinación R^2 , que relaciona el área bajo la curva con la concentración, debe ser por lo menos de 0.995. Por ello se determina la ecuación de la recta:

$$y = bx + a$$

Ecuación 3.1. Ecuación de la recta

Donde:

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto

- Ecuación para hallar b:

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Ecuación 3.2.

- Ecuación para hallar a:

$$a = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n}$$

Ecuación 3.3.

Luego se calcula el Coeficiente de correlación “r” el cual expresa el grado de relación entre las variables X e Y mediante la siguiente ecuación:

$$r = \frac{n \Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \sqrt{n \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}}$$

Ecuación 3.4.

El valor $r=1$ nos indica que obtuvimos una correlación perfecta positiva, $r=-1$ nos indica que obtuvimos una correlación perfecta negativa y un $r=0$ nos indica que no existe correlación entre X e Y. En este caso, nuestro valor fue de 0.9995, como se observa en la Figura 3.8, por lo que se considera a la técnica como lineal.

3.3.1.2.2. PRECISIÓN

Este parámetro nos indica la dispersión de las medidas en torno de su valor medio, por ello se procedió a medir la precisión de manera repetitiva (misma analista, mismo instrumento). Podemos expresarla matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o el coeficiente de variación (CV) mediante la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación 3.5.

Donde:

CV: Coeficiente de variación

s: Desviación estándar

\bar{x} : Media aritmética

La AOAC establece que, para su aceptación una técnica analítica por HPLC, el coeficiente de variación porcentual C.V. %, que relaciona las cuatro réplicas de cada punto de concentración en la calibración, depende del valor de su concentración como se observa en la Tabla 3.5.

En este caso, los valores del C.V. % que se observan en la Tabla 3.4, oscilan entre 0.47 % y 4.68 % por lo que se consideran aceptables ya que se encuentran entre los límites de 5.3 % - 11 % como se observa en la Tabla 3.5 exceptuando el C.V. % de 13.50 % que corresponde a la concentración de 5 ppm debido a que la concentración utilizada de quercetina fue baja.

Tabla 3.5. Precisión esperada (repetibilidad) en función de concentración de analito

[56]

UNIDAD	RSDr %
100 %	1.3
10 %	1.9
1 %	2.7
0.1 %	3.7
100 ppm(mg/kg)	5.3
10 ppm(mg/kg)	7.3
1 ppm(mg/kg)	11
100 ppb (µg/kg)	15
10 ppb(µg/kg)	21
1 ppb(µg/kg)	30

3.3.1.2.3. SENSIBILIDAD

Se establecen dos parámetros a determinar: el límite de detección (LOD), que es la concentración por encima de la cual se puede asegurar la presencia de una sustancia química en una muestra, y el límite de cuantificación (LOQ), que es la concentración por encima de la cual se puede asegurar que el valor de concentración de la sustancia química determinado en la muestra por la técnica analítica es el correcto.

Ambos límites pueden ser calculados a partir de la curva de regresión, por la extrapolación a concentración cero, para ello se determina la pendiente en la gráfica de calibración. Luego se extrapola la respuesta a concentración cero, logrando un valor estimado de la respuesta del blanco “Ybl”.

Se determina la desviación estándar de cada concentración, se calcula la recta entre la concentración versus desviación estándar y se extrapola de nuevo a concentración cero, logrando la desviación estándar del blanco “Sbl”.

En el límite de detección se determina 3 desviaciones estándar para el blanco y en el caso del límite de cuantificación son 10 desviaciones estándar para el blanco.

Tales valores se calculan mediante las siguientes fórmulas algebraicas y los resultados los observamos en la Tabla 3.6.:

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Ecuación 3.6.

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Ecuación 3.7.

Donde:

Ybl: Valor estimado de la respuesta del blanco

Sbl: Desviación estándar del blanco

b: Valor de la pendiente

n: Número de muestras

Tabla 3.6. Resultados del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación(LOQ)

Límite de detección (LOD)	3.83 mg/L
Límite de cuantificación (LOQ)	11.62 mg/L

Fuente: Elaboración propia

3.3.1.3. TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA HPLC

Para el tratamiento de las muestras (extractos concentrados de *Moringa oleifera*), en tubos de microcentrífuga se pesó 100 mg de cada extracto, se llevó a volumen final de 1 mL con metanol grado HPLC y se llevó a baño de ultrasonido durante 5 minutos. Se filtró cada muestra sobre viales de inyección a través de una membrana de 0.2 μm de diámetro de poro. Se insertó los viales en el equipo autosampler junto a los estándares. Utilizando las condiciones cromatográficas establecidas anteriormente se corrió los extractos de *Moringa oleifera*, obteniéndose los cromatogramas mostrados en la Figura 3.9.

En cada cromatograma se elucidó diversos picos a diversos tiempos de retención, particularmente dichos perfiles refirieron mayor concentración de compuestos desconocidos en E1 que en E2, y este a su vez más que en E3. A pesar de ello, en ninguno de los cromatogramas figuró un pico en el tiempo de retención correspondiente a los estándares de quercetina; por lo que, hasta el momento, los extractos de *Moringa oleifera* parecían no contener quercetina.

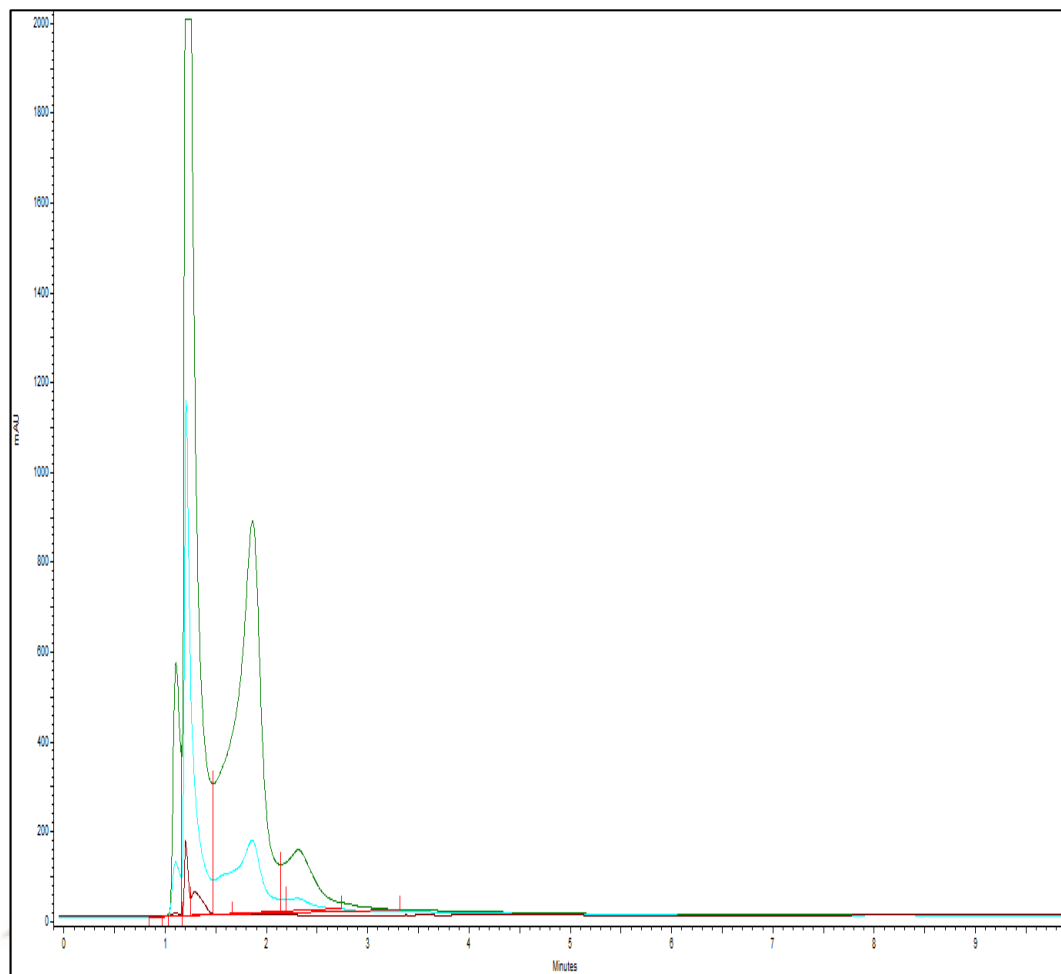


Figura 3.9. Cromatogramas de los extractos de *Moringa oleifera*. En verde: E1. En celeste: E2. En marrón: E3.

Sin embargo, Ndong y colaboradores determinaron la presencia de quercetina en *Moringa oleifera* en forma de heterósido, específicamente quercetina-3-glucósido.

Asimismo, en dos trabajos de investigación realizados por Amaglo y Bennett junto a sus colaboradores, determinaron heterósidos de quercetina en extractos de hojas de *Moringa oleifera*. [47-49]

Se propone hidrolizar el heterósido quercetina-3-glucósido para así poder aislar la quercetina como se muestra en la siguiente reacción Figura 3.10.

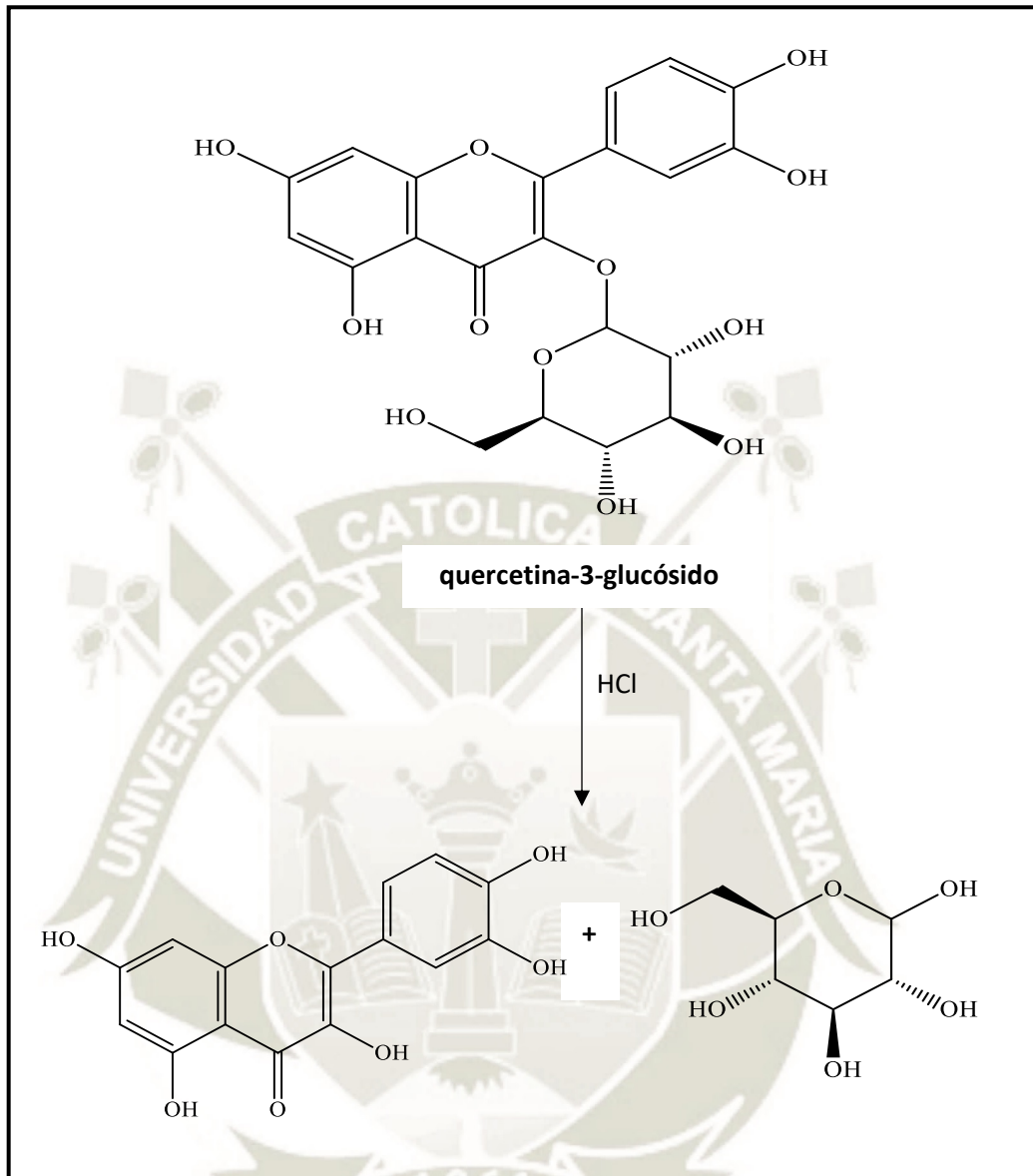


Figura 3.10. Reacción de hidrólisis de quercetina

Fuente: Elaboración propia (ChemDraw Ultra 12.0)

Se decidió entonces realizar una hidrólisis ácida a los extractos de *Moringa oleifera* con el fin de hidrolizar los puentes éter que unían al flavonoide quercetina con el azúcar. Para ello se pesó 100 mg aproximadamente de extracto concentrado de *Moringa oleifera* en un vial de reflujo. Se disolvió en 2 mL de metanol y se agregó 1 mL de HCl 2 M. Se insertó un agitador magnético, se conectó a un sistema refrigerante y a una hornilla eléctrica. Se encendió la hornilla y el extracto fue sometido a reflujo durante 2 horas. El

arreglo experimental de la hidrólisis ácida de los extractos de hojas de *Moringa oleifera* se presenta en la Figura 3.11.



Figura 3.11. Arreglo experimental de la hidrólisis de extractos de *Moringa oleifera*.

Al término, se neutralizó la suspensión resultante con 1 mL de NaOH 2 M. Se filtró hacia viales de inyección y se realizó la lectura de las muestras hidrolizadas mediante HPLC por duplicado, considerando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. De este modo se obtuvo los cromatogramas presentados en la Figura 3.12.

Similarmente, en cada cromatograma se elucidó diversos picos a diversos tiempos de retención, y dichos perfiles refirieron mayor concentración de compuestos desconocidos en E1 (Extracto con metanol como solvente) que en E2 (Extracto con éter dietílico como solvente), y este a su vez más que en E3 (Extracto con hexano como solvente). Aunque, a diferencia del procedimiento anterior, en esta ocasión se observó picos en el tiempo de retención correspondiente a los estándares de quercetina, confirmándose la hipótesis propuesta en relación a la quercetina en forma de heterósido.

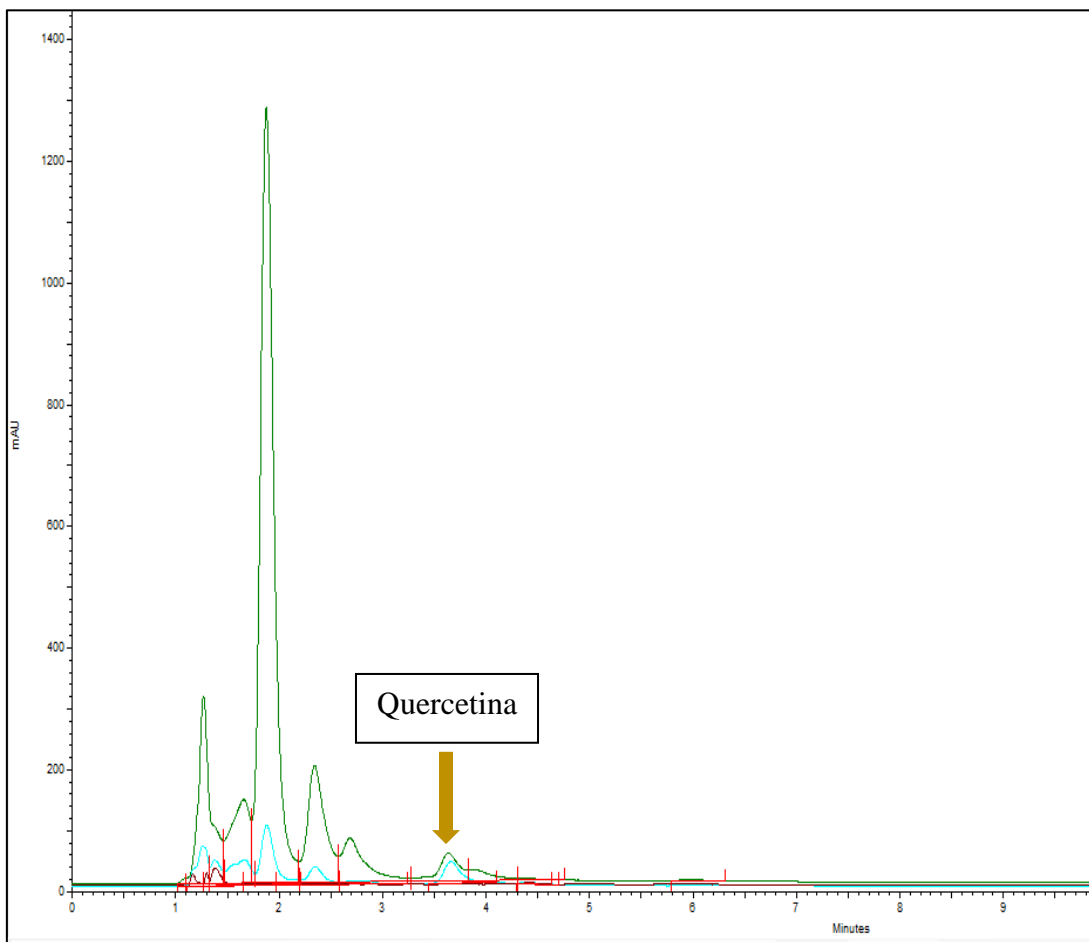


Figura 3.12. Cromatogramas de los extractos hidrolizados de *Moringa oleifera*. En verde: E1. En celeste: E2. En marrón: E3.

Se integró las áreas bajo la curva de los picos correspondientes a quercetina como se observa en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Área bajo la curva (AUC) de los picos de quercetina en los extractos hidrolizados de *Moringa oleifera*.

Extractos	(AUC) 1	(AUC) 2	Promedio
E1(extracto con metanol)	2447528	2505032	2476280
E2(extracto con éter dietílico)	1705972	1729160	1717566
E3 (extracto con hexano)	0	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Luego se determinó la concentración de quercetina en cada extracto de hojas de *Moringa oleifera* mediante la ecuación 3.8.

$$\text{Concentración de quercetina} = \frac{\text{Área del pico-Intercepto}}{\text{Pendiente}} \times \frac{\text{Volumen final (4 mL)}}{\text{Peso de extracto (mg)}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times \frac{10^6\text{mg}}{1\text{Kg}}$$

Ecuación 3.8. Cálculo de la concentración de quercetina en el extracto vegetal

La concentración de quercetina en los diferentes extractos se muestran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Concentración de quercetina (mg/Kg)

Extracto	Solvente	Concentración de quercetina (mg/Kg)
E1	Metanol	436.44± 5.22
E2	Éter dietílico	319.81±1.98
E3	Hexano	No se identificó

Fuente: Elaboración propia

3.3.2. MÉTODO CUPRAC

Se preparó Rx 1, Rx 2 y Rx 3 como está descrito en el apartado 2.3.2. Para la gráfica de calibración se preparó una solución stock pesando 0.5 g de ácido ascórbico, se transfirió a una fiola de un litro y se enrasó con etanol al 96 % (500 ppm). Se preparó 5 estándares y un blanco de etanol en fiolas de 100 mL transfiriendo del stock a través de una bureta: 1/2/3/4/5 mL, enrasando con etanol. En tubos de ensayo se mezcló 1 mL de Rx 1) + 1 mL de Rx 2) + 1 mL de Rx 3) + 0.5 mL de estándar + 0.5 mL de agua ultrapura. Se agitó y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a $\lambda = 450$ nm. Se generó una ecuación de regresión lineal, considerando las concentraciones de los estándares: 0.625/1.25/1.875/2.5/3.125 mg/L de ácido ascórbico. Los datos correspondientes se presentan en la Tabla 3.9. El gráfico de calibración correspondiente se muestra en la Figura 3.13. Una muestra de los estándares preparados se presenta en la Figura 3.14 A.

Tabla 3.9. Calibración de cinco puntos con estándares de ácido ascórbico

Concentración	Absorbancia (AU)			Promedio (AU)	St. Dev.	C.V.%
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3			
0.625 ppm	0.060	0.058	0.065	0.063	0.0029	4.56
1.250 ppm	0.115	0.112	0.130	0.129	0.0135	10.49
1.875 ppm	0.179	0.171	0.204	0.196	0.0151	7.70
2.500 ppm	0.242	0.234	0.258	0.244	0.0136	5.57
3.125 ppm	0.292	0.294	0.319	0.301	0.0159	5.28

St. Dev: Desviación estándar. C.V.%: Coeficiente de variación porcentual.

Fuente: Elaboración propia

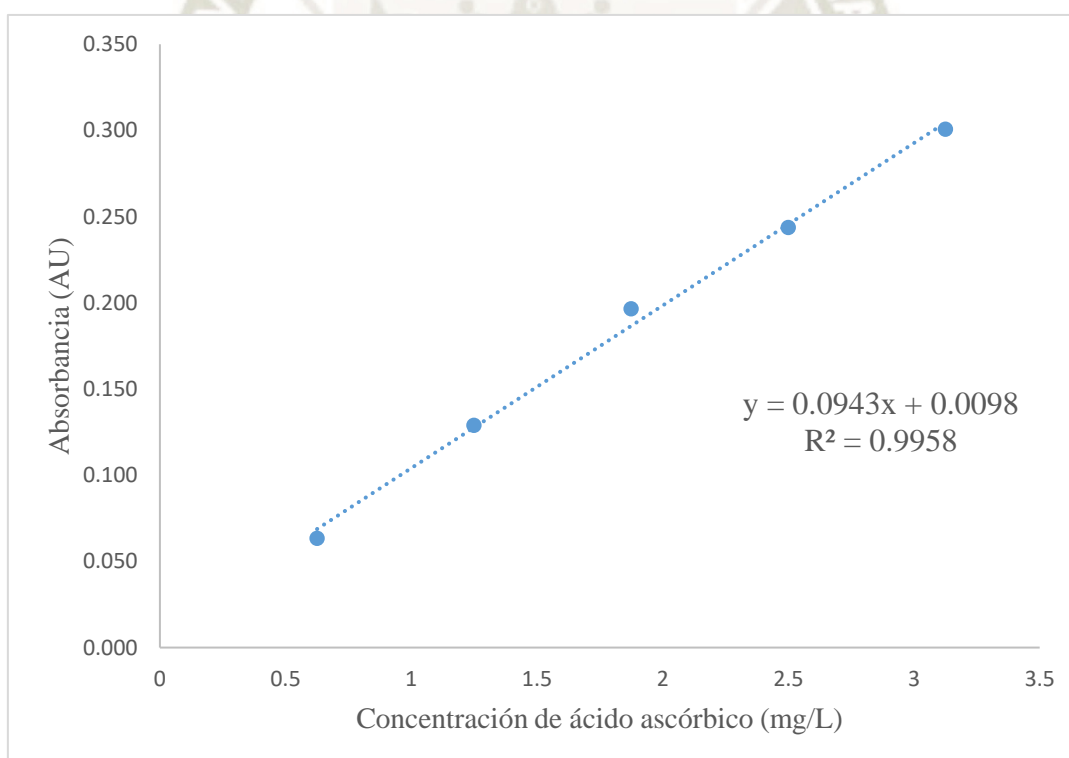


Figura 3.13. Gráfico de calibración de la capacidad antioxidante por CUPRAC

Para el tratamiento de extractos de *Moringa oleifera* se preparó diluciones seriadas del extracto vegetal en base 10. Para ello se pesó 100 mg aproximadamente de cada extracto en un tubo de microcentrífuga y se disolvió con metanol hasta llegar a un volumen final de 1 mL. Se transfirió 100 μ L a un segundo tubo de microcentrífuga y se añadió 900 μ L de metanol.

En tubos de ensayo se mezcló 1 mL de Rx 1) + 1 mL de Rx 2) + 1 mL de Rx 3) + 0.5 mL de muestra + 0.5 mL de agua ultrapura. Se agitó y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a $\lambda = 450\text{nm}$ y se obtuvo la capacidad antioxidante. Las muestras tratadas se presentan en la Figura 3.14 B.

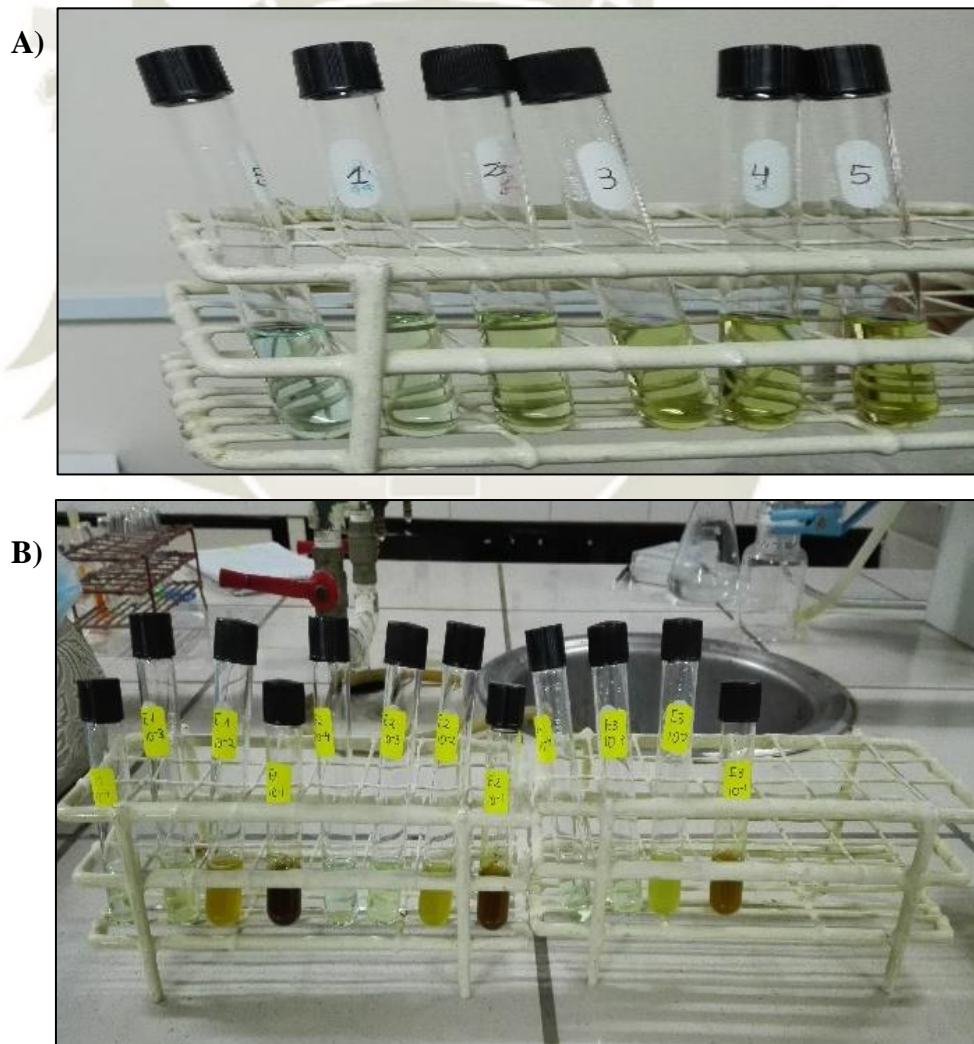


Figura 3.14. Capacidad antioxidante por el método CUPRAC. A. Estándares de ácido ascórbico. B. Muestras de *Moringa oleifera* diluidas.

Se determinó la concentración de ácido ascórbico en el extracto vegetal, utilizando la ecuación de regresión lineal que se muestra en la Figura 3.13, considerando las absorbancias de las muestras tratadas. Tales valores se presentan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Absorbancias de los extractos diluidos de hojas de *Moringa oleifera*

Extracto y dilución	Absorbancia (AU)			Promedio (AU)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	
E1	4	4	4	4
E1, 10 ⁻¹	2.571	2.552	2.552	2.558
E1, 10 ⁻²	0.279	0.279	0.278	0.279
E1, 10 ⁻³	0.031	0.031	0.031	0.031
E2	4	4	4	4
E2, 10 ⁻¹	2.135	2.135	2.135	2.135
E2, 10 ⁻²	0.250	0.250	0.250	0.250
E2, 10 ⁻³	0.075	0.075	0.075	0.075
E3	4	4	4	4
E3, 10 ⁻¹	1.403	1.403	1.403	1.403
E3, 10 ⁻²	0.218	0.218	0.218	0.218
E3, 10 ⁻³	0.053	0.053	0.053	0.053

Fuente: Elaboración propia

La capacidad antioxidante resultante de los extractos de hojas de *Moringa oleifera* se observa en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *Moringa oleifera*

Extracto	Solvente	Capacidad antioxidante (mg ácido ascórbico equivalente/Kg extracto)
E1	Metanol	318.61
E2	Éter dietílico	303.55
E3	Hexano	266.00

Fuente: Elaboración propia

Por su parte, Singh y colaboradores determinaron 1069.05 ppm de ácido ascórbico en extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera*.^[50]

3.4. CORRELACIÓN ENTRE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE – QUERCETINA

Para comparar estadísticamente la concentración de quercetina entre E1 y E2 se realizó un test F para varianzas entre dos grupos, obteniéndose un valor $p = 0.231344$ ($p > 0.05$), por lo que las varianzas entre ambos resultados son iguales. Los datos se observan en la Tablas 3.13 y Tabla 3.14 (ANEXO I).

Posteriormente, se realizó un test t de student para muestras de varianzas iguales, obteniendo un valor p de 0.001143 ($p < 0.05$) y concluyendo que existe diferencia significativa entre la concentración de quercetina de E1 y E2. los datos se observan en la Tabla 3.13 y Tabla 3.15 (ANEXO I).

Para comparar estadísticamente la capacidad antioxidante entre E1, E2 y E3 se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), obteniendo un valor $p = 9.59832E-12$ ($p < 0.05$), lo que nos indica que la capacidad antioxidante muestra diferencia significativa en al menos uno de los extractos. Los datos se observan en la Tabla 3.16 y Tabla 3.17 (ANEXO I).

Seguidamente se realizó un test de Scheffe para determinar las diferencias entre cada uno de los extractos, obteniéndose un valor ($p < 0.05$) en todas las comparaciones posibles. Los datos se observan en la Tabla 3.18 (ANEXO I)

También se realizó un test de Tukey el cual demuestra que existe diferencia muy significativa entre los tres extractos, como se observa en la Tabla 3.19. Además, esto se evidencia en el gráfico de caja y bigotes, Figura 3.16.

Se concluyó que existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de E1(Extracto con metanol como solvente), E2(Extracto con éter dietílico como solvente) y E3(Extracto con hexano como solvente).

Para correlacionar la capacidad antioxidante de *Moringa oleifera* y su contenido de quercetina, los resultados de ambos experimentos se expresaron en unidades de mg/Kg de extracto, como se muestra en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de quercetina

Extracto	Solvente	Capacidad antioxidante (mg/Kg)	Concentración de quercetina (mg/Kg)
E1	Metanol	318.61	436.44± 5.22
E2	Éter dietílico	303.55	319.81±1.98
E3	Hexano	266.00	No se identificó

Fuente: Elaboración propia

Se observó que existe una relación directa entre la capacidad antioxidante y el contenido de quercetina de los extractos de *Moringa oleifera*. Asimismo, se observó que, a medida que disminuía la polaridad del solvente, tanto la capacidad antioxidante como la concentración de quercetina de cada extracto, iban en decremento. Indudablemente, además de la quercetina, existen otras sustancias químicas en los extractos de *Moringa oleifera* que les aportan capacidad antioxidante, puesto que el extracto E3 presentó capacidad antioxidante a pesar de no detectársele la presencia de quercetina. Se correlacionó la capacidad antioxidante

de los extractos de *Moringa oleifera* con su concentración de quercetina mediante un análisis de regresión lineal como se presenta en la Figura 3.15.

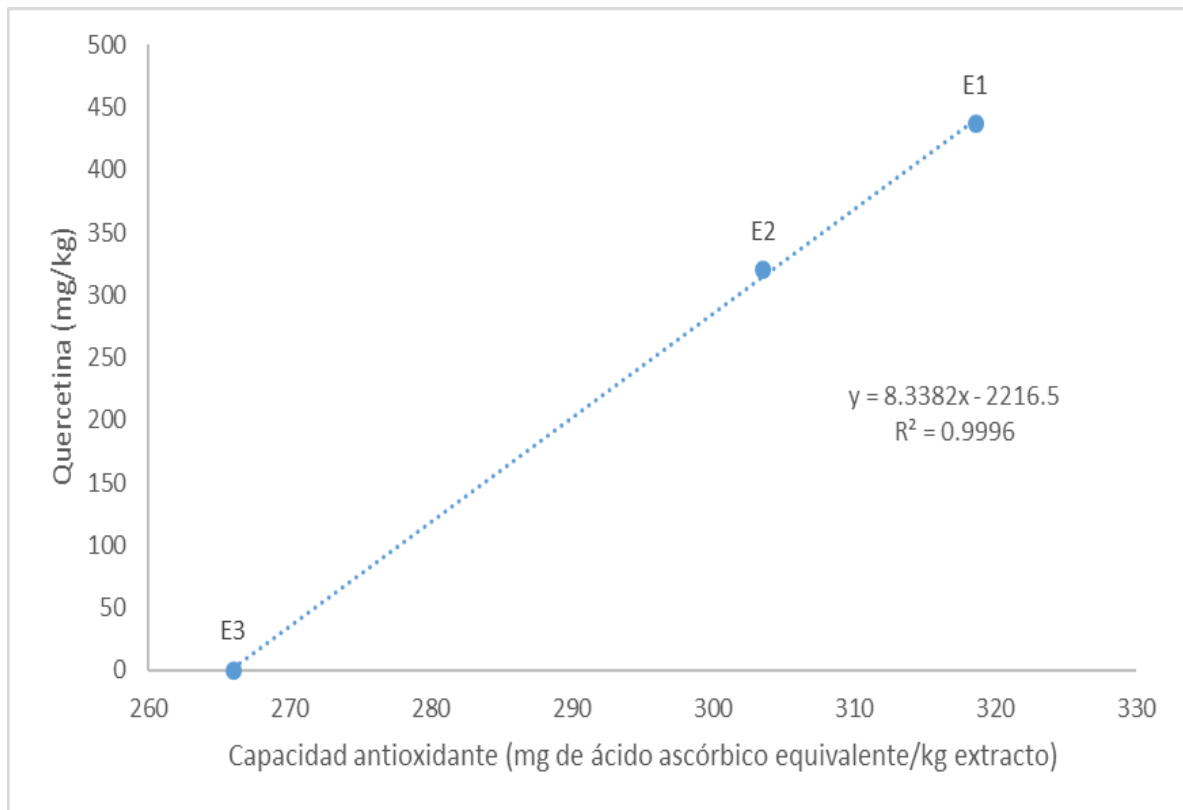


Figura 3.15. Correlación entre la concentración de quercetina y la capacidad antioxidante de *Moringa oleifera*

El coeficiente de determinación $R^2 = 0.9996$ mostrado en la Figura 3.15 indica una buena correlación entre la concentración de quercetina y la capacidad antioxidante de *Moringa oleifera*, de acuerdo a los extractos vegetales preparados.



CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se obtuvo extractos de *Moringa oleifera* “moringa” a partir de las hojas del espécimen vegetal mediante el método de percolación, utilizando tres solventes: metanol, éter dietílico y hexano, con un porcentaje de rendimiento para E1(Extracto con metanol) de 14.47 %, para E2(Extracto con éter dietílico) de 5.13 % y para E3(Extracto con hexano) de 4.43 %

SEGUNDA: Se determinó la concentración de quercetina de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) obteniéndose 436.44 ± 5.22 mg/kg de quercetina en E1(Extracto con metanol) y 319.81 ± 1.98 mg/kg de quercetina en E2(Extracto con éter dietílico). En E3(Extracto con hexano) no se identificó quercetina.

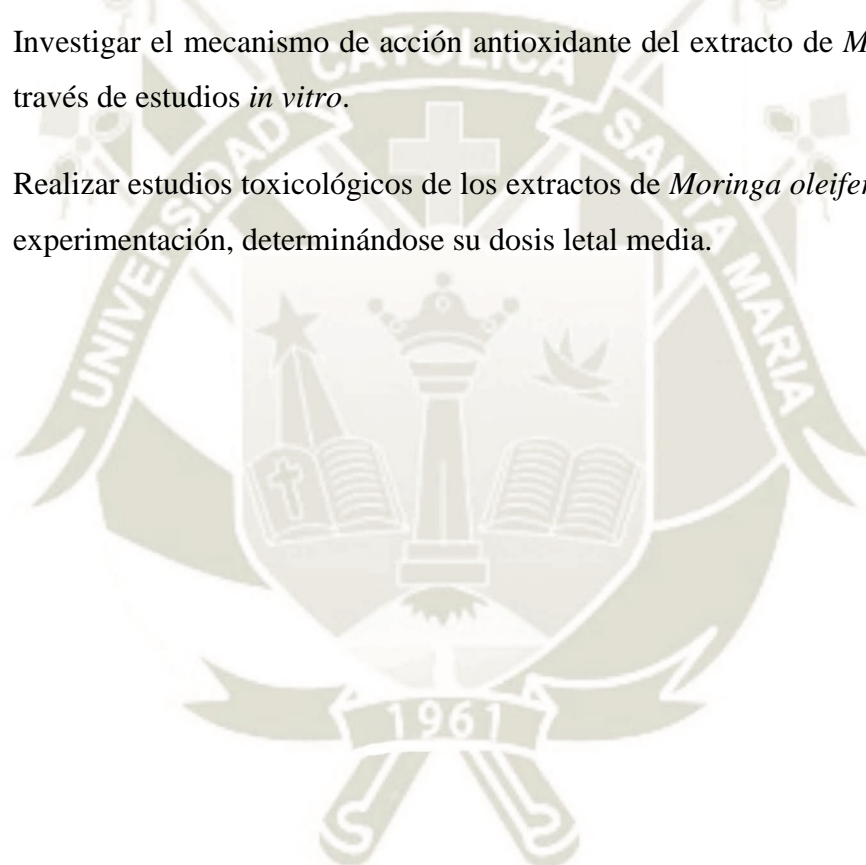
TERCERA: Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” haciendo uso del método CUPRAC, obteniéndose 318.61 mg de ácido ascórbico equivalente/kg de extracto en E1(Extracto con metanol), 303.55 mg de ácido ascórbico equivalente/kg de extracto en E2(Extracto con éter dietílico) y 266.00 mg de ácido ascórbico equivalente/kg de extracto en E3(Extracto con hexano).

CUARTA: Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *Moringa oleifera* “moringa” y su relación con el contenido de quercetina.

QUINTA: Existe una relación directa entre la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” con la concentración de quercetina.

SUGERENCIAS

1. Realizar mayores estudios a los extractos vegetales de *Moringa oleifera*, fraccionándolos para determinar los principios activos con mayor capacidad antioxidante.
2. Realizar mezclas de solventes para así comprobar si la capacidad antioxidante de *Moringa oleifera* se debe a los compuestos polares o a los no polares.
3. Investigar el mecanismo de acción antioxidante del extracto de *Moringa oleifera* a través de estudios *in vitro*.
4. Realizar estudios toxicológicos de los extractos de *Moringa oleifera* en animales de experimentación, determinándose su dosis letal media.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Nadkarni et al. (1976) Indian Materia Medica. Popular Prakashan: Bombay, 810–816
- [2]. Ramachandran et al. (1980) “Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable” *Econ Bot* 34: 276–283.
- [3]. Morton (1991) “The horseradish tree, *Moringa pterigosperma* (Moringaceae). A boon to arid lands” *Econ Bot* 45: 318–333
- [4]. *Moringa oleifera*: Health benefits [en línea] Sharma, N. [fecha de acceso 17 de junio de 2018]. URL disponible en: <http://advantavita.com/moringa-oleifera/>
- [5]. *Moringa oleifera* images [en línea] Mercadente, M. [fecha de acceso 17 de junio de 2018]. URL disponible en: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Moringa+oleifera>
- [6]. *Moringa oleifera* images [en línea] Crops for the future. [fecha de acceso 17 de junio de 2018]. URL disponible en: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Moringa+oleifera>
- [7]. Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Moringa oleifera* Lam. [en línea] United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. [fecha de acceso 17 de junio de 2018]. URL disponible en: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=MOOL>
- [8]. Wealth of India (1962) Council Sci. Ind. Res. Vol. VI. pp. 425-428
- [9]. Aykroyd et al. (1966) “The nutritive value of Indian foods and the planning of satisfactory diets” *Indian Council Medical Res.*, New Delhi. p. 55, 61, 91, 97
- [10]. Kerharo et al. (1969) “Un remede populaire Sengalais: Le ‘Nebreday’ (*Moringa oleifera* lann.) employs therapeutiques en milieu Africain chimie et pharmacologie” *Plantes Med Phytother* 3:14–219
- [11]. Ruckmani et al. (1998) “Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity” *Indian J Pharm Sci* 60: 33–35
- [12]. Siddhuraju et al. (2003) “Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.)” *J Agric Food Chem* 15: 2144–2155.
- [13]. Faizi et al. (1998) “Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*” *Planta Med* 64: 225–228

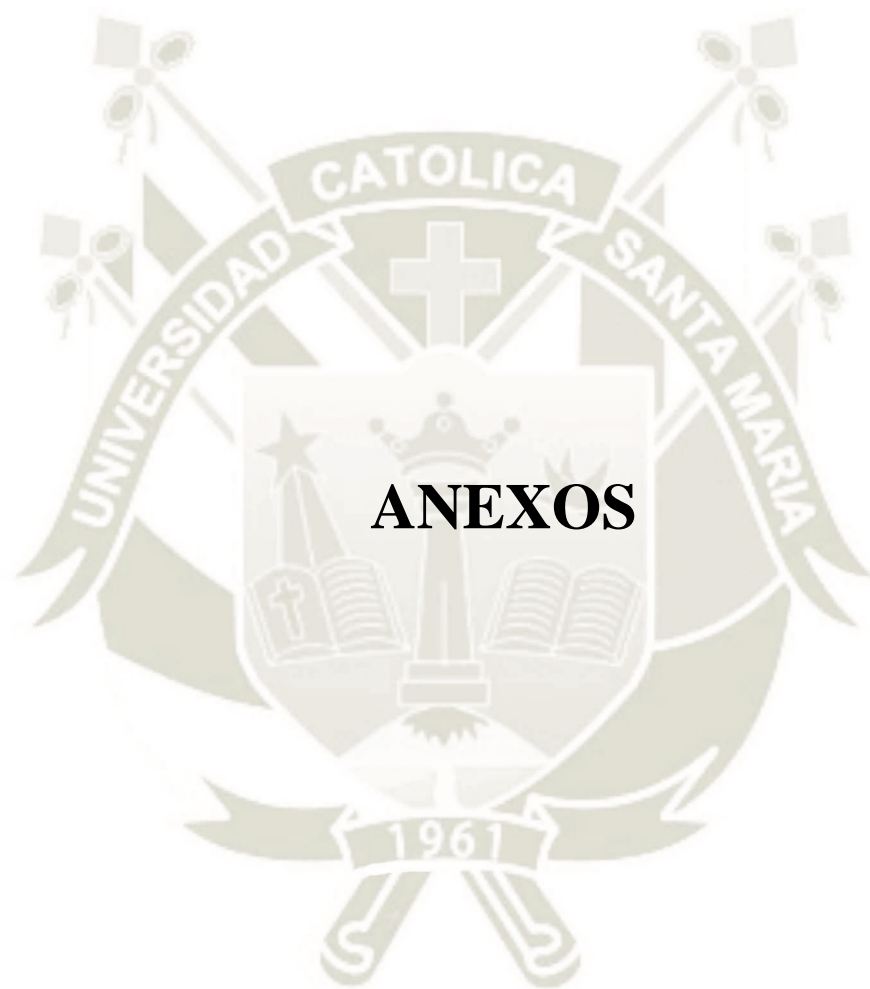
- [14]. Faizi et al. (1994) “Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure” J Nat Prod 57: 1256–1261
- [15]. Faizi et al. (1994) “Novel hypotensive agents, niazimin A, niazimin B, niazicin A and niazicin B from *Moringa oleifera*; Isolation of first naturally occurring carbamates” J Chem Soc Perkin Trans I: 3035–3640
- [16]. Gilani et al. (1994) “Pharmacological studies on hypotensive and spasmodic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*” Phytother Res 8: 87–91
- [17]. Pal et al. (1995) “Studies on the antiulcer activity of *Moringa oleifera* leaf extract on gastric ulcer models in rats” Phytother. Res. 9: 463-465
- [18]. Ghasi et al. (2000) “Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats” J. Pharmacol. 2000, 69, 21-25
- [19]. Pérez et al. (2000) “Métodos para medir el daño oxidativo”. Rev Cubana Med Milit 29 (3):192-8.
- [20]. Lindsay et al. (2002) “European research on the functional effects of dietary antioxidants _EUROFEDA”. Aspects Med. 23(1/3):1-38.
- [21]. Jones (2006) “Redefining oxidative stress”. Antioxid Redox Signal. 8(9-10): 1865-79.
- [22]. Martínez et al. (2005) “Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients with macroangiopathic complication”. Acta Farm Bonaerense. 24 (2):197-203.
- [23]. Rodríguez et al. (2001) “Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo”. Rev. Cubana Med Milit. 30(1):15-20.
- [24]. Cherubini et al. (2008) “Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke”. Curr. Med Chem. 15(12):1236-48.
- [25]. Bowler et al. (2002) “Oxidative stress in airways. Is there a role for extracellular superoxide dismutase?” Am J Respir Crit Care Med. 166: S38- S43.
- [26]. Ballester (1996) “Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico”. Med Clin Barc. 107:509-515.
- [27]. Elejalde (2001) “Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes”. An Med Intern 18(6):326-35.
- [28]. Rodríguez et al (2003) “Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante”. Rev Cien Med. 9(2):98-105.
- [29]. Pérez (2000) “El estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno”. Rev Cubana Endocrinol. 11(3):139-42

- [30]. Kuklinski. “Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural”. (2003)
- [31]. Zhang et al. (2005) “Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br.” Separation and Purification Technology 42(3): 283-290
- [32]. Soni et al. (2010) “Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563” World Journal of Microbiology and Biotechnology 26(11): 2009-2018
- [33]. Wang, W. (2000) “Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals” International Journal of Pharmaceutics 203(1-2): 1-60
- [34]. Wu et al. (1998) “An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC–DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons” Journal of Chemometrics 12(1): 1-26
- [35]. Tomás et al. (2001) “HPLC–DAD–ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums” Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(10): 4748-4760
- [36]. Kammerer et al. (2004) “Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS” Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(14): 4360-4367
- [37]. Liu et al. (2007) “Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC–MS” Journal of Chromatography B 846(1-2): 32-41
- [38]. Barros et al. (2009) “Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species” Food and Chemical Toxicology 47(6): 1076-1079
- [39]. Oey et al. (2006) “Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study” Eur Food Res Technol 223: 71-77
- [40]. Fernández et al. (2001) “Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging” Eur Food Res Technol 213: 290-296
- [41]. Rojas et al. (2001) “Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion” Journal of The Science of Food and Agriculture 81(15): 1433-1439

- [42]. Wen et al. (2013) “Polyphenol oxidase inactivation and vitamin C degradation kinetics of Fuji apple quarters by high humidity air impingement blanching” *International Journal of Food Science and Technology* 48(6): 1135-1141
- [43]. Quaglia et al. (1996) “Temperature and pressure stability of l-ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study” *Lebensmittel Wiss u –Technol* 25: 52–55
- [44]. Broeck et al. (1998) “Kinetics for Isobaric–Isothermal Degradation of l-Ascorbic Acid” *J. Agric. Food Chem.* 46(5): 2001-2006
- [45]. Vongsak et al. (2013) “Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method” *Industrial Crops and Products* 44: 566-571
- [46]. Pal et al. (1995) “Studies on the Antiulcer Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Gastric Ulcer Models in Rats” *Phytotherapy Research* 9: 463-465
- [47]. Ndong et al. (2007) “Effects of Oral Administration of *Moringa oleifera* Lam on Glucose Tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar Rats” *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40(3): 229-233
- [48]. Amaglo et al. (2010) “Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana” *Food Chemistry* 122(4): 1047-1054
- [49]. Bennett et al. (2003) “Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi-Purpose Trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L.” *J. Agric. Food Chem.* 51(12): 3546-3553
- [50]. Singh et al. (2009) “Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*” *Food and Chemical Toxicology* 47(6): 1109-1116
- [51]. Romero Maria. (2017) “Desarrollo de electrodos modificados con polímeros conductores y nanopartículas para la determinación de actividad antioxidante. Aplicación en Agroalimentación” [Tesis Doctoral] Universidad de Córdoba. Argentina.
- [52]. Karasakal Ayca. (2015) “Evaluation of antixoidant activities of brassica napus’s seeds by CUPRAC, ABTS/persulfate and DMPD method”.*Journal Marmara Pharmaceutical.* 2(19):153-158.
- [53]. Bharali R, Tabassum J, Azad MRH. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* junio de 2003;4(2):131-9.

- [54]. Ezeamuzie IC, Ambakederemo AW, Shode FO, Ekwebelem SC. Antiinflammatory Effects of Moringa oleifera Root Extract. *Int J Pharmacogn.* 1 de enero de 1996;34(3):207-12
- [55]. Kofi et al. (2017) “Potential production of biodiesel from green microalgae” *Biofuels.* DOI: 10.1080/17597269.2017.1348188
- [56]. Analysis AOMo. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.





ANEXO I

Pruebas estadísticas

Tabla 3.13. Concentración de quercetina en cada uno de los extractos.

Extractos	Concentración (mg Quercetina/Kg Extracto)	
	Extracto 1	432.7516
Extracto 2	318.4077	321.2128
Extracto 3	0	0

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.14. Prueba F para varianzas entre dos grupos

	Extracto 1	Extracto 2
Media	436.439668	319.8102265
Varianza	27.2042771	3.934169077
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	6.91487238	
P(F<=f) una cola	0.23134447	
Valor crítico para F (una cola)	161.447639	

Fuente: Elaboración propia (Excel)

Tabla 3.15. Prueba t de student para muestras de varianzas iguales

	Extracto 1	Extracto 2
Media	436.4397	319.8102
Varianza	27.20428	3.934169
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	15.56922	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	29.55798	
P(T<=t) una cola	0.000571	
Valor crítico de t (una cola)	2.919986	
P(T<=t) dos colas	0.001143	
Valor crítico de t (dos colas)	4.302653	

Fuente: Elaboración propia (Excel)

Tabla 3.16. Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *Moringa oleifera*

Extractos	Concentración (mg ácido ascórbico equivalente/Kg extracto)		
Extracto 1	319.0046	319.0046	317.8195
Extracto 2	303.5511	303.5511	303.5511
Extracto 3	265.9989	265.9989	265.9989

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.17. Análisis de Varianza de una vía (ANOVA)

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Extracto 1	3	955.8288181	318.609606	0.4681523
Extracto 2	3	910.6532339	303.551078	0
Extracto 3	3	797.9968517	265.9989506	0

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4404.802612	2	2202.401306	14113.3641	9.59832E-12	5.14325285
Dentro de los grupos	0.936304606	6	0.156050768			
Total	4405.738916	8				

Fuente: Elaboración propia (Excel)

Tabla 3.18. Test de Scheffe

. oneway CAPANTIOX EXTRACTOS , scheffe

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	4404.80125	2	2202.40063	14113.57	0.0000
Within groups	.936290801	6	.156048467		
Total	4405.73754	8	550.717193		

Comparison of CAPANTIOX by EXTRACTOS
(Scheffe)

Row Mean-		
Col Mean	1	2
2	-15.0585	
	0.000	
3	-52.6106	-37.5521
	0.000	0.000

Fuente: Elaboración propia (Stata/MP 14.0)

Tabla 3.19. Test de Tukey

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>EXTRACTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Ext3(Hex)	3	265.999	x
Ext2(Et)	3	303.551	x
Ext1(MeOH)	3	318.61	x

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Ext1(MeOH) - Ext2(Et)	*	15.0585	0.789237
Ext1(MeOH) - Ext3(Hex)	*	52.6107	0.789237
Ext2(Et) - Ext3(Hex)	*	37.5522	0.789237

* denotes a statistically significant difference.

Gráfico Caja y Bigotes

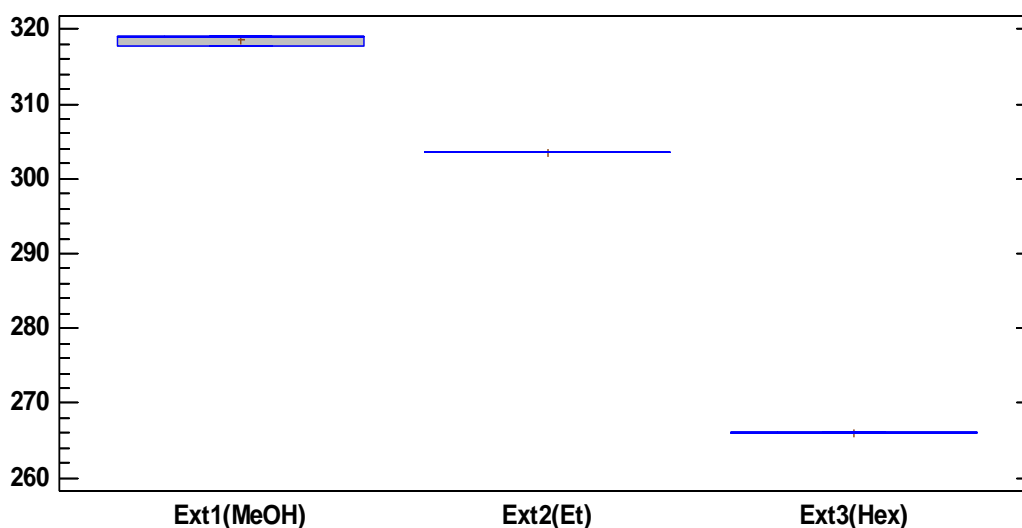


Figura 3.16. Comparación de la Capacidad Antioxidante de los tres extractos.

ANEXO II

Constancia de identificación del espécimen vegetal “*Moringa oleifera*”



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 020-2018-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.


HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca de la planta presentada por Gabriela Candelaria Berlanga Cruz de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia de la Universidad Particular Católica Santa María, para la Ejecución de su trabajo “Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Moringa oleifera* “moringa” por el método de Indofenol y HPLC Arequipa 2018-2019”. Las muestras fueron traídas al laboratorio de botánica, para la determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie y clasificación:

Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Brasicales
Familia	Moringaceae
Genero	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Moringa oleifera</i> Lam

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Arequipa 23 de abril del 2018.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ