



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO Y
MOLECULAR (ANBIOMOL)
“PROF. GUILLERMO LÓPEZ CORCUERA”**



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE EXTRACTOS METANÓLICOS
DE HOJAS, FLORES Y
SEMILLAS DE *Moringa oleífera* DE MÉRIDA (VENEZUELA)**

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciados en
Bioanálisis

Autores:

Br. Auri Dariana García Márquez

Br. María Alejandra Molina Contreras

Tutora:

Dra. Elizabeth Pérez

Mérida, 2020

DEDICATORIA

Los grandes logros nacen de grandes sacrificios y nunca son frutos del egoísmo.

Napoleón Hill

Es por ello que dedicamos nuestro trabajo de grado a esas personas que nos han enseñado que con sacrificio, constancia, perseverancia, amor, dedicación y de la mano de Dios se materializan los sueños.

Auri García

A mi madre Audora por su constante apoyo y palabras de motivación que nos permiten hoy día ver consolidado nuestro sueño

A mi padre Ivan Dario a pesar de no estar físicamente conmigo, siempre está presente en mis pensamientos, eres mi guía y apoyo.

A mi hija Daribeth porque me das la motivación que necesito para seguir creciendo profesionalmente.

María Alejandra Molina

A mis madres Herminia y Anita sin ellas este logro no fuera posible

A mi abuelo Hildo por ser mi figura paterna y brindarme su ejemplo de vida

A mi mamá Coco por brindarme su apoyo y consejos que forjaron en mí valores de responsabilidad y compromiso.

AGRADECIMIENTO

Luego de un camino de esfuerzo y dedicación, la mayor satisfacción que puede existir para un ser humano, es la consolidación de sus sueños. Es por ello, que hoy agradezco:

A mi **Padre Celestial**, por regalarme la vida, brindarme sabiduría, salud, protección y guiarme en todo momento, por permitirme finalizar esta meta tan anhelada, sin ti no soy nada.

A mi madre **Audora**, por acompañarme en cada paso que doy, por ser mi estímulo para seguir adelante, gracias por tu apoyo incondicional, eres mi ejemplo de lucha y perseverancia, este logro es tuyo, Te Amo Madre.

A mi hija hermosa **Daribeth**, con tu llegada a mi vida mayor son mis motivos de lucha y superación, gracias por cada muestra de cariño hija, que mi logro te sirva de ejemplo para un futuro, juntas hemos logrado con mucho sacrificio esta meta, Te Amo Princesa.

A mi **Familia**, de manera general agradezco a todos por su apoyo y palabras motivadoras, que este logro permita demostrarles que cada sacrificio vale la pena, gracias a todos.

A mi compañera de Trabajo de grado **María**, gracias por brindarme tu amistad y apoyo.

A la tutora **Dra. Elizabeth Pérez**, gracias por brindarnos sus conocimientos y apoyarnos en esta etapa de formación académica.

A la Ilustre **Universidad de Los Andes**, por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente, eternamente agradecida. Orgullosa de ser Ulandina
A todas esas personas que me brindaron su apoyo incondicional, por esas palabras motivadoras que valen mucho en esta etapa de formación.

Gracias a Todos

Auri García.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a **Dios** por la maravillosa oportunidad de vivir este momento tan importante de mi formación profesional, por guiarme a lo largo de mi camino, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad. Gracias señor gracias.

A mis madres **Herminia y Anita** por el apoyo incondicional, ese que nunca me faltó para la consolidación de este sueño que también es de ustedes, gracias a sus esfuerzos y sacrificios hoy podemos decir que lo hemos logrado, gracias infinitas, las amo.

De igual forma, agradezco a mis **hermanos** que con sus palabras me hacen sentir orgullosa de lo que soy y de lo que les puedo enseñar, que este triunfo les sirva en el porvenir de sus vidas.

También le agradezco a mi compañero de vida **Juan Carlos**, por el apoyo, palabras de motivación y paciencia, gracias amor.

De manera especial, a la tutora **Dra. Elizabeth Pérez** por haberme guiado y apoyado en la realización de este trabajo de investigación.

A la **Universidad de Los Andes**, por la oportunidad de brindarme sus aulas y excelentes profesionales para el enriquecimiento de mis conocimientos.

De forma general agradezco a mis familiares y amistades que de una u otra forma me brindaron su apoyo.

Gracias a Todos

María Alejandra Molina

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación e Importancia de la Investigación	8
Objetivos de la Investigación	9
<i>Objetivo General</i>	9
<i>Objetivos Específicos</i>	10
Alcances y Limitaciones de la Investigación	10
<i>Alcances de la Investigación</i>	10
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	11
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	12
Trabajos Previos	12
Antecedentes Históricos	17
Bases Teóricas	19
<i>Moringa oleífera</i>	19
<i>Antioxidante</i>	20
<i>Actividad Antioxidante</i>	20
<i>Actividad Antioxidante Total (AAT)</i>	21
<i>Metabolitos Secundarios</i>	22
<i>Metabolitos Secundarios de Moringa sp.</i>	22

<i>Radicales Libres</i>	23
<i>Estrés Oxidativo</i>	24
Definición Operacional de Términos	24
<i>Extractos</i>	24
<i>Fenoles</i>	25
<i>Flavonoides</i>	25
<i>Polifenoles</i>	25
<i>Carotenoides</i>	25
<i>Isotiocianatos</i>	26
<i>In vitro</i>	25
Operacionalización de las Variables	26
Hipótesis de la Investigación	27
CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO	28
Tipo de Investigación	28
Diseño de la Investigación	29
Población y Muestra	30
<i>Unidad de Investigación</i>	31
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	32
Sistema de Variables	32
Instrumento de Recolección de Datos	33
Procedimientos de la Investigación	33
<i>Preparación de la Muestra</i>	33
<i>Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo</i>	34
<i>Método de la Actividad Antioxidante (AOA)</i>	35
<i>Método del Cation Radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en Solución Etanólica</i>	37

<i>Método de la determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos</i>	38
<i>Método para la determinación de la Concentración de Proteínas</i>	39
<i>Método para la determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio</i>	40
Diseño de Análisis	41
<i>Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)</i>	41
<i>Pruebas Post-Hoc</i>	42
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Resultados	43
<i>Caracterización química de los extractos metanólicos de M. oleífera</i>	44
<i>Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de M. oleífera</i>	45
Discusión	48
<i>Caracterización química</i>	48
<i>Actividad Antioxidante y su correlación con parámetros químicos</i>	51
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
Conclusiones	56
Recomendaciones	57
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Ubicación del Cultivo de <i>M. oleífera</i> donde se tomaron las muestras de estudio	30
FIGURA 2: Planta de <i>M. oleífera</i> donde se tomaron las muestras en estudio en Santa Cruz de Mora, Estado Mérida (Venezuela)	31

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 1: Representación Esquemática Método de Halliwell <i>et al.</i> , (1987) para la medición del Radical Hidroxilo	35

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Propiedades descritas de <i>M. oleífera</i> en los diferentes estudios realizados en los últimos cinco años	5
TABLA 2. Operacionalización de las variables	26
TABLA 3. Volúmenes necesarios para el Método AOA	36
TABLA 4. Volúmenes de reactivos necesarios para la curva de calibración en la determinación de proteínas	39
TABLA 5. Concentración media de flavonoides y grupos fenólicos de las muestras analizadas	45
TABLA 6. Actividad Antioxidante de los extractos analizados por los Métodos de AOA, Radical Hidroxilo y AAT	46
TABLA 7. Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos	47



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO Y
MOLECULAR (ANBIOMOL)
“PROF. GUILLERMO LÓPEZ CORCUERA”**



Autores:

Auri Dariana García

María Alejandra Molina

Tutora: Dra. Elizabeth Pérez

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE EXTRACTOS METANÓLICOS
DE HOJAS, FLORES Y SEMILLAS DE *Moringa oleífera* DE MÉRIDA
(VENEZUELA)**

RESUMEN

El estudio realizado tuvo como objetivo confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* de Mérida-Venezuela en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, correlacionándolos con el contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas presentes en las mismas. Las muestras fueron obtenidas en un cultivo localizado en la parroquia Mesa de Las Palmas, Santa Cruz de Mora, Estado Mérida. A través del análisis realizado a los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* se obtuvieron concentraciones de flavonoides de 1779,6: 1383,0 y 73,4mg equivalentes de quercitina/ g de extracto, respectivamente. Mientras tanto, los valores encontrados para el contenido de polifenoles fueron 3,4; 1,9 y 0,4mg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto de hojas, flores y semillas. Por otra parte, los valores de concentración de proteínas obtenidos fueron nulos. Asimismo se evaluó la actividad antioxidante a través de los métodos AOA, porcentaje de inhibición del radical hidroxilo, y AAT por el método de ABTS. Donde se determinó una fuerte correlación positiva entre el contenido de polifenoles y flavonoides y la actividad antioxidante presente en los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, para los métodos de AOA, porcentaje de inhibición del radical hidroxilo, y AAT por el método de ABTS.

Palabras Claves: *Moringa oleífera*, extractos metanólicos, polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante

INTRODUCCIÓN

Moringa oleífera (*M. oleífera*) es la especie más ampliamente cultivada de la familia *Moringaceae*. Es un árbol de rápido crecimiento (también conocido como el árbol de rábano, árbol de baquetas, kelor, marango, moonga o aceite de árbol de ben), que por sus características biológicas y su fácil adaptabilidad a diferentes climas ha sido introducido en muchos lugares de los trópicos (Muñoz, 2015). Es un árbol de madera blanda de baja calidad, sin embargo durante años se ha aprovechado en el campo de la medicina, industria y otros usos tradicionales. Todas las partes del árbol son comestibles y hace tiempo que ha sido consumido por los seres humanos (Fahey, 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que la actividad antioxidante de diferentes suplementos alimenticios puede contribuir significativamente con la salud humana, y en la mayoría de los casos la actividad antioxidante ha sido atribuida al contenido de compuestos fenólicos presentes en una muestra. Por ejemplo, en las hojas de *M. oleífera* se han identificado flavonoides, los cuales son conocidos por sus propiedades antioxidantes y los efectos antiproliferativos que pueden proteger el cuerpo contra diversas enfermedades y trastornos (Yang *et al.*, 2008).

A pesar de su utilidad ancestral, su aplicación ha sido más bien empírica y la mayor parte de la información existente proviene de la tradición o de publicaciones de carácter general. Solo a finales del siglo XX este árbol empezó a recibir una merecida atención por parte de la comunidad científica. Durante las últimas dos décadas se han publicado numerosos reportes sobre la evaluación científica de los procesos de utilización de la planta, así como la identificación de principios activos y mecanismos de acción, lo que ha permitido explicar muchos de los efectos beneficiosos previamente

conocidos, optimizar su explotación y proponer nuevas aplicaciones. Algunos usos aún no han sido confirmados científicamente y requieren de investigación futura (Martín *et al.*, 2013).

Es por ello, que el objetivo de la investigación es la evaluación de la actividad antioxidante en extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, así como la medición del contenido de polifenoles y flavonoides, para determinar si existe correlación entre estos últimos parámetros y la actividad antioxidante, siendo éste uno de los primeros estudios que se realizará en Venezuela, con el propósito de confirmar y explicar científicamente las propiedades antioxidantes que posee esta planta.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La Moringa es una planta con reconocidas propiedades alimenticias y medicinales, proveniente del sur del Himalaya, que se ha extendido a otras partes de India, sudeste asiático, Caribe, Centroamérica, Pakistán y gran parte de América del Sur. Son árboles de climas tropicales y subtropicales, pertenecientes a la familia *Moringaceae*, que comprende 13 especies de las cuales la más reconocida es *M. oleífera*. A su vez, *M. oleífera* es una fuente rica de sustancias antioxidantes, las cuales ayudan en la prevención de formaciones malignas y mejoran la salud cardiovascular. En consecuencia, reducen el efecto de los radicales libres (RL), responsables del envejecimiento y el deterioro general del organismo. Se ha encontrado en numerosos estudios que reduce el daño oxidativo (Atawodi *et al.*, 2010; Sreelatha *et al.*, 2009).

Lim (2012) describió a la Moringa como un árbol caducifolio (de hoja caduca), muy ramificada a los 10 m, con fruncido, corteza gris que se desprende en escamas de corcho, madera suave y blanca, raíz tuberosa penetrante y una corona delgada; las hojas son alternas, 2-3 pinnadas de hasta 60 cm de largo, con 4-6 pares de pinnas algo agrupadas hacia el final de la ramita. Pecíolo de 4-15 cm de largo, 1-6 mm peciólulos; valvas elípticas

u ovoides, 0,5-3 m por 0,3 a 2 cm, delgadas, glabros o puberulentas, de color verde grisáceo. Las inflorescencias son paniculadas, axilares, con numerosos blanco cremoso, fragante, flores zigomórficas. El fruto es alargado, pendular, lineal, en forma de daga, 3-anguloso, 9-nervada, dividiéndose en tres valvas. Semillas numerosas, subglobosos, 1-1,4 cm de diámetro, con tres alas delgadas y embebidos en la placenta carnosa blanquecina.

Se han atribuido muchos usos a *M. oleífera* (Fuglie, 1999). Algunos de ellos consisten en el cultivo en franjas (producción de biomasas), como forraje para animales (hojas y semillas tratadas), producción de biogás (de las hojas), productos de limpieza doméstica (hojas trituradas), colorante azul (madera), esgrima (árboles vivos), fertilizantes (semilla), nutriente foliar (jugo exprimido de las hojas), abono verde (de hojas), goma (de troncos de árboles), la miel y el jugo de la caña de azúcar-clarificador (semillas en polvo), miel (néctar de las flores), uso medicinal (todas las partes de la planta), plantas ornamentales, regulador de la estructura del suelo (incorporación al suelo de las hojas para evitar el ahogamiento de las plántulas ocasionado por falta de aireación e inmovilización de algunos nutrientes), pulpa (madera), cuerda (corteza), tanino para curtir cuero (corteza y las encías), purificación del agua (semillas en polvo) y como aceite (extraído de semilla de moringa con un rendimiento del 30-40 % en peso), también conocido como aceite de Ben.

A su vez, los beneficios que se pueden percibir en cuanto al tratamiento y prevención de enfermedades, y al tratamiento de infecciones a través de la aplicación de preparados de *M. oleífera* no están tan bien entendidos como sus beneficios nutritivos (Palada, 1996). De igual manera, además de los altos valores nutricionales de *M. oleífera*, se caracteriza por ser una planta que contiene actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y otras propiedades que contribuyen en el control y

prevención de problemas cardiovasculares, basándose en la mayoría de los casos en estudios de pruebas *in vitro* (Castillo *et al.*, 2016). En efecto, aquí se intentan revisar algunos de los principales beneficios que se le han atribuido a la planta y la calidad y naturaleza de la evidencia disponible (Sampson, 2005; Talalay y Talalay, 2001).

Estudios recientes han demostrado el efecto de sus diferentes estructuras para inhibir el crecimiento de bacterias, logrando identificar 44 componentes de los aceites esenciales de las hojas que pueden ser utilizados en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades cutáneas. Sin embargo, los más importantes son los compuestos llamados isotiocianatos, capaces de inhibir bacterias como *Helicobacter pylori*, causante de úlceras gástricas, duodenales y cáncer de estómago. De igual forma, se ha logrado inhibir la proliferación de bacterias patógenas de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella*, responsables de infecciones estomacales y pulmonares (Rodríguez, 2018) (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades descritas de *M. oleífera* en los diferentes estudios realizados en los últimos cinco años.

Parte del árbol	Efecto descrito	Tipo de Estudio
Semillas	Antiinflamatorio en colitis ulcerosa	<i>In vivo</i> (rata)
Hoja	Antioxidante en esteatosis hepática	<i>In vivo</i> (ratón)
Hoja	Antioxidante directo e indirecto	<i>In vitro</i> (hepatocitos ratón)
Corteza	Inmunomodulador/antiinflamatorio vascular	<i>In vitro</i> (monocitos humanos)
Hoja	Antiinflamatorio vascular	<i>In vitro</i> (macrófagos ratón)
Semilla	Antioxidante hepático en dietas grasas	<i>In vivo</i> (ratón) e <i>in vitro</i> (hepatocitos ratón)
Semilla	Control de la diabetes mellitus tipo 1	<i>In vivo</i> (rata)
Hoja	Control de la diabetes mellitus tipo 2	<i>In vivo</i> (humanos)
Hoja	Protector en intoxicación por arsénico	<i>In vivo</i> (ratón)
Hoja	Disminuye la fatiga muscular	<i>In vivo</i> (rata)
Semilla y vaina	Antimicrobiano bacterias multirresistentes	Cultivo (Gram+ y Gram -)
Semilla	Antimicrobiano en biofilms	Biofilms
Hoja	Antimicrobiano bacterias multirresistentes	Cultivo (Gram -)
Hoja, semilla, tallo, vaina y flor	Antimicrobiano (<i>Vibrio spp.</i> y <i>E. coli</i>)	En agua contaminada
Semilla	Antimicrobiano (<i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	En agua contaminada
Hoja	Antiséptico de manos (<i>E. coli</i>)	<i>In vivo</i> (humanos)

Fuente: Doménech *et al.*, (2017),

Por otro lado, el estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un Radical Libre (RL) que le afecta (Reyes *et al.*, 2011). Así, en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de RL u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógenos y endógenos). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Cuando se rompe el equilibrio, éste se podrá asociar con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los RL (Quintanar, 2009).

Los RL se liberan durante el metabolismo, y también se producen por contaminantes ambientales (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Se pueden relacionar con el consumo o uso de tóxicos como el alcohol, tabaco y drogas, o debido a una alimentación no adecuada, y exposición a fertilizantes o pesticidas. Se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psíquico (Llancari, 2011).

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones y en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo, inhibiendo la tasa de oxidación. La preservación de la salud del organismo depende en gran medida de la existencia de sistemas eficaces de defensa antioxidantes que actúen contra el daño producido por RL y especies reactivas de oxígeno (EROs) (Halliwell *et al.*, 1999).

Muchos de los antioxidantes naturales son conocidos como metabolitos secundarios, que son compuestos orgánicos constituyentes de alimentos de origen vegetal, que no son nutrientes y que proporcionan al alimento unas propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales propiamente dichas. Estas sustancias parecen ser responsables, al menos en parte, del papel beneficioso para la salud asociado al consumo de frutas y hortalizas, y alimentos derivados de ellas (Santos y Tomás, 2001). Recientemente, se ha demostrado la presencia en *M. oleífera* de importantes

metabolitos secundarios responsables de sus propiedades curativas. En uno de los primeros estudios exhaustivos sobre la composición química de esta especie se reveló que es rica en varias sustancias muy peculiares como glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos, distribuidos en las distintas partes del árbol (Benett *et al.*, 2003).

Algunos autores se han inclinado por el estudio de la actividad antioxidante de *M. oleífera*. Al respecto, Singh *et al.*, (2014) sugieren que las actividades antioxidante y hepatoprotectora de hojas de *M. oleífera* están posiblemente relacionadas con la actividad de eliminación de RL, lo que podría deberse a la presencia de fenoles totales y flavonoides en el extracto y/o los compuestos purificados beta-sitosterol, quercetina y kaempferol, que fueron aislados a partir del extracto de hojas de *M. oleífera*.

Gupta *et al.* (2012) encontraron que la evolución de la diabetes se redujo significativamente después del tratamiento de extractos con metanol de vainas de *M. oleífera* (MOMtE). Además, el tratamiento con MOMtE aumentó los niveles de antioxidantes en el tejido pancreático, con la consiguiente disminución de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. El examen histológico del páncreas de ratas diabéticas mostró cambios degenerativos en las células β . El tratamiento con MOMtE invierte significativamente el daño histoarquitectural a las células islotes. Es decir, los extractos de *M. oleífera* ejercen efectos protectores contra la diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). El MOMtE exhibió actividad antidiabética y antioxidante significativa, siendo posible aislar componentes activos a partir del extracto para la evaluación en estudios clínicos futuros.

Después de describir la situación actual del problema los autores de esta investigación formularon el siguiente enunciado holopráxico:

¿Existe correlación entre la Actividad Antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* y el contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas, en el Laboratorio de Análisis

Biocnol3gico y Molecular (ANBIOMOL) "Prof. Guillermo L3pez Corcuera" de la Facultad de Farmacia y Bioan3lisis, Universidad de los Andes, M3rida-Venezuela, desde Enero 2019 hasta Julio 2019?

Justificaci3n e Importancia de la Investigaci3n

M. oleifera es un 3rbol caducifolio, de crecimiento r3pido, con ra3ces tuberosas y gruesas, hoja verde claro, de floraci3n abundante, con frutos en c3psulas alargadas y colgantes y que contienen semillas oscuras. Se asocia a zonas tropicales y subtropicales, bastante resistente a la sequ3a, con una temperatura de crecimiento ideal de 25-35°C, aunque puede tolerar hasta los 48°C. En muchas zonas el consumo de la moringa (hojas, frutos, vaina, flores o ra3z) est3 arraigado en la cultura popular debido a las propiedades curativas que se le atribuyen para el tratamiento de diferentes afecciones, por lo que tambi3n se la denomina "3rbol milagro", y se utiliza habitualmente como remedio natural para gran diversidad de afecciones como la fiebre de la malaria o fiebre tifoidea, otitis, infecciones oculares, hiperglucemia, hipertensi3n, parasitosis intestinales, anemias o dermatitis, entre otras. Los motivos para esta gran variedad de funciones pueden ser atribuidos a su alto poder nutritivo. Se describe que onza por onza, las hojas de moringa contienen m3s vitamina A que las zanahorias, m3s calcio que la leche, m3s hierro que las espinacas, m3s vitamina C que las naranjas, y m3s potasio que los pl3tanos (Dom3nech *et al.*, 2017).

Socialmente, esta planta es considerada como una fuente sobresaliente de prote3nas altamente digestibles, proveedora de calcio (Ca), hierro (Fe), vitamina C y carotenoides adecuados para su uso en muchas de

las regiones en desarrollo del mundo, donde la desnutrición es una de las principales preocupaciones (Muñoz, 2015). Es por ello, que cada vez es mayor la existencia de investigaciones sobre las propiedades benéficas que contiene *M. oleífera*, las cuales antiguamente no eran evaluadas científicamente. En efecto, la comunidad científica describe en los últimos años el mecanismo de acción de muchas de estas propiedades curativas, en multitud de estudios con diferentes partes de la estructura de la moringa y con diferentes diseños metodológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Doménech *et al.*, 2017).

Por lo descrito anteriormente, esta investigación se basó en el estudio de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* de Mérida-Venezuela, además determinó las concentraciones de proteínas, polifenoles y flavonoides de dichos extractos, brindando la oportunidad de describir la composición bioquímica y bioactividad de esta planta de uso ancestral, dando validez científica a los reportes informales de su poder curativo. Además, es uno de los primeros reportes de este tipo de actividad en plantas de moringa, originarias de los Andes venezolanos.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* de Mérida-Venezuela en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López

Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, desde Enero 2019 hasta Julio 2019.

Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de grupos fenólicos, flavonoides y proteínas en las muestras de extractos metánolicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*.
- Comprobar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* por medio de tres métodos *in vitro* (Método de actividad antioxidante total-AAT, Método del AOA, efecto sobre el radical hidroxilo).
- Correlacionar la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *M. oleífera* con su contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas.

Alcances y Limitaciones de la Investigaciones

Alcances de la Investigación

Los estudios científicos sobre las propiedades nutritivas y terapéuticas que presenta la *M. oleífera* han ido aumentando en los últimos años, pues anteriormente su uso se generaba mayormente por la cultura popular basándose en los efectos curativos publicitarios que se distribuían en la

población, más no por las investigaciones científicas formales que se hayan realizado acerca de esta planta. Es importante indicar que en Venezuela su utilización terapéutica se ha incrementado en los últimos años, aun sin existir cierta cantidad de estudios científicos que confirmen sus propiedades nutritivas y terapéuticas.

Es por ello, que el objetivo de la investigación era confirmar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, mediante diferentes técnicas de evaluación como: Actividad Antioxidante (AOA), Actividad antioxidante total (AAT) y efecto sobre el radical hidroxilo, con la finalidad de obtener información que permitiera confirmar los beneficios terapéuticos que aporta esta planta, haciendo énfasis en que es uno de los primeros estudios científicos realizados en Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Limitaciones de la Investigación

En cuanto a las limitaciones de la investigación la obtención de los reactivos y suministros fue una de ellas, por los altos costos y dificultades que se presentaron al momento de adquirirlos, lo cual impidió una realización más amplia de esta investigación. A su vez, los constantes paros universitarios también fueron limitantes que impidieron el correcto desenvolvimiento de la investigación, que permitió confirmar la actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

M. oleífera es un cultivo originario del norte de la India, de la familia *Moringácea* (Sánchez-Cordova *et al.*, 2015). Es una planta que cuenta con prestigio y reconocimiento en el ámbito científico por sus propiedades de utilidad en los campos farmacológico y ambiental. Acerca de los usos medicinales con alto valor nutricional, diferentes partes de la planta contienen un perfil de minerales importantes, y son una buena fuente de proteínas, vitaminas, β -caroteno, aminoácidos y varios compuestos fenólicos (Villareal y Ortega, 2014). Sus hojas poseen una gran capacidad antioxidante, gracias a su alto contenido de polifenoles y flavonoides (Sánchez-Cordova *et al.*, 2015). Además, esta planta cuenta con un perfil nutritivo que tiene la capacidad de suplir los requerimientos de micronutrientes necesarios en una dieta saludable (Villareal y Ortega, 2014). Todo esto conlleva a que se genere un enorme interés que impulsa la realización de investigaciones científicas en las cuales se evalúe la bioactividad de *M. oleífera*, buscando conocer claramente las propiedades terapéuticas que contiene.

Actualmente la comunidad científica contempla varias líneas de investigación sobre las propiedades nutricionales y terapéuticas de Moringa. Es por ello, que Lamou *et al.* (2016) evaluaron los efectos del extracto

acuoso de *Moringa oleífera* para determinar actividad antifatiga y antioxidante en ratas Wistar macho (130-132 g), las cuales fueron sometidas a pruebas de natación. Cuatro grupos de ratas (16 por grupo) se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio y se les administró agua destilada, 100, 200 o 400 mg/kg de extracto, respectivamente, durante 28 días. El día 28, 8 ratas de cada grupo se sometieron a la prueba de natación forzada con carga en la cola (10% del peso corporal). Las 8 ratas restantes por grupo se sometieron a la natación libre de 90 minutos. Se midió el tiempo máximo de natación, glucemia, lactamia, uremia, trigliceridemia, glucógeno hepático y muscular, parámetros hematológicos y parámetros de estrés oxidativo (superóxidodismutasa, catalasa, glutatión reducido y malondialdehído). Los resultados obtenidos indican que el extracto de *M. oleífera* aumentó el tiempo máximo de natación, hemoglobina en sangre, glucosa en sangre, y reservas de glucógeno hepático y muscular. El extracto también aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes y disminuyó las concentraciones en sangre de malondialdehído. Además, disminuyó las concentraciones de lactato, triglicéridos y urea en la sangre. En conclusión, las propiedades antifatiga del extracto de *M. oleífera* se demuestran por su capacidad para mejorar las reservas de energía corporal y la capacidad antioxidante para reducir la acumulación de ácido láctico en el tejido.

De igual manera, Sánchez-Cordova *et al.* (2015) determinaron la capacidad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides totales en hojas y raíz primaria de árboles de 2 años de *M. oleífera*, crecidos en el invernadero de baja tecnología del ITSTB. Para ello obtuvieron los extractos utilizando un gradiente de polaridad, con solventes orgánicos: hexano, acetato de etilo (AcEt) y metanol (MeOH). Posteriormente se filtraron, concentraron y llevaron a peso constante. La capacidad antioxidante de los extractos se estimó mediante los métodos de DPPH y ABTS, obteniendo en ambos casos la mayor actividad antioxidante en los extractos de hoja. Para determinar el

contenido de fenoles totales y flavonoides se siguió la metodología descrita por Atmani *et al.* (2013). Los autores concluyeron que los árboles de *M. oleífera* crecidos en el invernadero de baja tecnología tienen un alto contenido de fenoles y flavonoides los que le confieren la capacidad antioxidante a la planta.

Mientras que Tumer *et al.* (2015) estudiaron el mecanismo por el cual las hojas de Moringa ejercen su función antioxidante. Se realizó un estudio *in vitro* con líneas celulares hepáticas Hepa 1c1c7 de ratón. El extracto de las hojas se separó en dos fases, una rica en polifenoles y otra en isotiocianatos. Para evaluar la acción antioxidante se diferenció entre una actividad indirecta (actividad de la NAD(P)H quinona oxidorreductasa1-NAQO1) y una actividad directa (capacidad de absorción de radicales de oxígeno-ORAC). Tras la adición del extracto y evaluación del mismo, los autores observaron que en la fracción rica en polifenoles hubo una mayor actividad de la NAQO1, mientras que la fracción rica en isotiocianatos produjo mayor absorción de radicales de oxígeno. De esta manera los autores explican que la actividad antioxidante de la hoja de moringa y su potencial terapéutico se debe, en parte, a la doble forma de actuación descrita.

Por otro lado, Castro *et al.* (2017) investigaron el impacto de los métodos de extracción (maceración, decocción, extracción asistida por microondas (MAE) y extracción asistida por ultrasonidos (UAE) sobre los compuestos fenólicos totales (TPC), la actividad antioxidante y la fracción en masa de fenólicos en varios extractos de plantas (*Punicagranatum*, *Juglans regia*, *Moringa oleífera* y *Cassia fistula*). Los resultados mostraron que, a pesar de la naturaleza de la matriz, los valores más altos de TPC en todas las muestras se obtuvieron por MAE de la siguiente manera: PP (18,92 ± 0,11), ML (15,19 ± 0,11), HL (12,69 ± 0,16) y WS (12,80 ± 0,11) mg de GAEg⁻¹ respectivamente, y exhibió una potente actividad antioxidante (de 0,28 ± 0,01 a 5,34 ± 0,02mgGAEg⁻¹), que representa fuentes de antioxidantes

potentes. El análisis LC-MS² reveló una amplia gama de compuestos fenólicos, destacando su contenido en ácidos fenólicos, flavonoides y lignanos. La presencia de diferentes moléculas de fenol demostró que el método de extracción tuvo influencia en el perfil fitoquímico. Finalmente, debido a su alta eficiencia de extracción, MAE fue la técnica de extracción más efectiva.

García Hernández (2017) realizó un estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleífera* de diferente origen geográfico. En su estudio buscó comparar la capacidad antioxidante del polvo de hoja de *M. oleífera* Lam de diferentes orígenes geográficos (Galicia y Guinea). Además, se estudió la relación entre la capacidad antioxidante de cada muestra y su cantidad de compuestos fenólicos. El contenido en fenoles totales fue medido por el método Folin-Ciocalteu, mientras que la actividad antioxidante se midió mediante dos ensayos espectrofotométricos de actividad antioxidante (DPPH y ABTS). Además, comparó tres solventes diferentes a la hora de extraer los compuestos fenólicos: metanol 80%, acetonitrilo 70% con ácido acético al 4% y agua destilada. Los resultados demostraron que hay una alta relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante y que el solvente que mejor los extrae es el agua destilada. Así mismo, demostró que las hojas cultivadas en Galicia poseen un mayor contenido en fenoles que las de Guinea y, por lo tanto, una mayor capacidad antioxidante.

Vats *et al.* (2017) evaluaron los compuestos bioactivos y potencial antioxidante del extracto hidroetanólico de *Moringa oleífera* Lam. de Rajasthan, India. El análisis fitoquímico y potencial antioxidante del extracto hidroetanólico de varias partes de plantas de *M. oleífera*, reveló que las hojas poseían el mayor contenido de fenoles totales (9,58 mg/g), *b*-caroteno (14,10 mg/g) y licopeno (2,60 mg/g). Las flores y la corteza mostraron el mayor contenido de flavonoides totales (3,5 mg/g) y antocianinas (52,80 mg/g),

respectivamente. Las hojas también mostraron máximo potencial antioxidante mediante el ensayo de eliminación de óxido nítrico (IC50 - 120 µg/mL) y ensayo de degradación de desoxirribosa (IC50-178 µg/mL). En lo que se refiere a la eliminación de radicales DPPH, se observó mayor actividad en flores (IC50-405 µg/mL). El estudio mediante cromatografía de gases-espectrofotometría de masas (GC-MS) reveló la presencia de 29, 36 y 24 compuestos en corteza, hoja y flor, respectivamente. Los constituyentes principales identificados fueron epiglobulol (41,68% en corteza), fitol (23,54% en hoja) y β -sitosterol (15,35% en flor). Los metabolitos secundarios identificados poseen varias actividades terapéuticas, incluido el potencial antioxidante, lo cual fue confirmado a través de informes anteriores. Además, la presencia de 1,1,3-trietoxubutano en todas las partes de la planta analizadas, lo proyecta como una fuente de tratamiento importante de aguas residuales como modificadores hidrofóbicos.

Por otro lado, Ogbunugafor *et al.* (2011) estudiaron las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del aceite de semilla de *Moringa oleífera*. Se extrajo aceite de semillas de *M. oleífera* Lam (*Moringaceae*) recolectadas de Enugu, Sureste de Nigeria y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes en comparación con el aceite de palmas Metro. Las semillas de *M. oleífera* dieron un rendimiento de aceite del 41,47% índice de refracción, punto de fusión (°C) y valor ácido (mg KOH/g) de 0-1. El aceite de *M. oleífera* fue $1,471 \pm 0,000$, $28,00 \pm 0,00$, $3,80 \pm 0,28$; mientras que el aceite de palma tuvo $1,473 \pm 0,000$, $31,00 \pm 0,00$, $6,20 \pm 0,35$, respectivamente. Del mismo modo, los valores de yodo (I₂/100g), saponificación (mg KOH/g) y peróxido (mMol/kg), para el aceite de *M. oleífera* fueron $85,30 \pm 0,25$, $171,90 \pm 0,56$ y $8,10 \pm 0,07$; mientras que el aceite de palma presentó valores de $34,70 \pm 0,13$, $210,50 \pm 0,00$ y $13,40 \pm 0,28$ respectivamente. La concentración de fenoles totales (mg de ácido gálico equivalente/g), flavonoides totales (mg equivalente/g) y la capacidad antioxidante total (mg de ácido ascórbico

equivalente/g) fueron $40,17 \pm 0,01$, $18,24 \pm 0,01$, y $37,94 \pm 0,02$ para el aceite de *M. oleífera*, y de $62,32 \pm 0,04$, $33,13 \pm 0,03$, y $68,27 \pm 0,02$ para el aceite de palma, respectivamente. El aceite de *M. oleífera* y el aceite de palma mostraron una concentración y reducción de radicales libres de DPPH dependientes de la concentración y capacidades de potencia. Este estudio ha demostrado que *M. oleífera* dio un alto rendimiento de aceite a partir de la semilla, que tiene buena capacidad antioxidante con potencial para aplicaciones industriales, nutricionales y de salud. El cultivo de esta planta económica podría utilizarse como estrategia de alivio para la pobreza en Nigeria.

Antecedentes Históricos

www.bdigital.ula.ve

Desde tiempos remotos, la Moringa ha sido usada en diferentes ámbitos, siendo utilizada por los reyes y reinas de la antigüedad en su dieta para el estado de alerta mental y la piel sana. Diferentes escritos Hindúes antiguos, que datan de años 150 a.C., se refieren a la planta Moringa y a sus usos. Los antiguos escritores sánscritos la conocían como una planta medicinal. Los primeros romanos, griegos y egipcios apreciaban a la Moringa por sus propiedades terapéuticas y también la utilizaban para proteger la piel, hacer perfumes y purificar el agua para beber (Cabrera, 2014).

La misma Biblia en el libro del Éxodos 15:22-27 se refiere a la planta como purificadora del agua del Mar Rojo. En el siglo XIX, exportaron el aceite de la Moringa de plantaciones en el Caribe hacia Europa, para la fabricación de perfumes y lubricantes para maquinaria. La Moringa ha estado dando pasos agigantados en varias sociedades por miles de años. Sus remedios

han pasado de generación en generación en medicina casera, considerándose uno de los descubrimientos más recientes de la ciencia moderna (Cabrera, 2014).

M. oleífera es la especie más conocida del género *Moringa*. Se encuentra diseminada en una gran parte del planeta, y en América Central fue introducida en los años 1920 como planta ornamental y para cercas vivas (Pérez *et al.*, 2010).

Uno de los primeros reportes formales acerca de la composición química de extractos de *M. oleífera* lo constituye el trabajo de Tee *et al.* (1997), quienes reportaron la composición de nutrientes de vainas frescas de esta planta, encontrando que cada 100 g de porción comestible 40kcal, 84,6g de agua, 5,5 g de proteínas, 0,3 g de grasas, 4,1 g de hidratos de carbono, 6,1 g de fibra, 0,8g de cenizas, 22 mg de calcio, 31 mg de fósforo, 0,3 mg de hierro, 3 mg de sodio, 208 mg de potasio, 75 mg de carotenos, 13 mg de vitamina A, 0,05 mg de vitamina B1, 0,12 mg de vitamina B2, 0,2 mg de niacina, y 258 mg de vitamina C.

Así mismo, en hojas de *Moringa* se identificaron flavonoides y sus respectivas cantidades, las cuales fueron quercetina 89,8mg/100g de peso fresco, kaempferol 36,3mg/100g de peso fresco, isorhamnetina 2,9mg/100g de peso fresco; para un contenido total de flavonoides de 129mg/100g de peso y de materia seca 25,5% (Yang *et al.*, 2008).

Por otra parte, los estudios realizados por Sreelatha y Padma (2009) sugirieron que los extractos de las hojas, tanto maduras y tiernas, de *M. oleífera* exhibieron una potente actividad antioxidante contra los radicales libres, previniendo el daño oxidativo a las biomoléculas más importantes y una protección significativa contra el daño oxidativo.

Bases Teóricas

Moringa oleífera

M. oleífera es originaria de la zona de los Himalayas y nativa de la India, Paquistán, Bangladesh y Afganistán. Su distribución se ha extendido al sureste de Asia, Asia occidental, Península Arábiga, este y oeste de África, e islas del Océano Índico y Pacífico. En América se le encuentra desde el sur de Florida (Estados Unidos de América) hasta Argentina, y en las islas del Caribe y las Indias occidentales (Velázquez-Zavala *et al.*, 2016).

Su nombre científico es *Moringa oleífera* (Velázquez-Zavala *et al.*, 2016); y se le conoce comúnmente como paraíso blanco, acacia, árbol de las perlas, chinto borrego, flor de Jacinto, paraíso de España, perlas de oriente, libertad, árbol de mostaza, árbol de rábano picante, maringacalalu, marango, marengo, carango, palo jeringa, jazmín marengo, y tamarindo cimarrón (Cabrera, 2014).

La ubicación taxonómica de la planta sería la siguiente (Jarrín, 2018):

Reino: Plantae

Familia: Moringaceae

Origen: Capparidales

Clase: Magnoleopsida

Género: *Moringa*

Especie: *oleífera*

Antioxidante

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Estos pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios; o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios (Zapata *et al.*, 2007).

Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete (Zapata *et al.*, 2007).

Actividad Antioxidante

Un número importante de especies de oxígeno altamente reactivas como el oxígeno singlete 1O_2 y $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , NO^{\cdot} y radicales libres alquil-peroxilo se producen regularmente en el organismo. Estos radicales pueden dañar a lípidos, proteínas y ADN, e intervenir en procesos de patogénesis y envejecimiento. De forma general, los sistemas de defensa fisiológica frente al daño generado por estos radicales se clasifican en tres categorías:

- Antioxidantes que previenen la formación de radicales libres.

- Antioxidantes captadores de radicales libres, que inhiben la iniciación del proceso oxidativo o bien interfieren en el proceso de propagación.
- Antioxidantes que actúan revirtiendo el proceso de oxidación.

La ingesta dietética de flavonoides, junto con otros antioxidantes naturales de eficacia comprobada, como las vitaminas C y E y carotenoides, coadyuvan en esos procesos de defensa. Los flavonoides se encontrarían dentro de las dos primeras categorías, es decir, son capaces de prevenir la formación de radicales libres o bien actúan como captadores de estos radicales una vez formados (Rice-Evans *et al.*, 1995; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Actividad Antioxidante Total (AAT)

www.bdigital.ula.ve

Avila *et al.*(2006) afirman que en la práctica se conoce como actividad antioxidante total (AAT) o capacidad antioxidante total (CAT) a la medición analítica de concentraciones de radicales de diferente naturaleza en un sistema oxidativo controlado (AAPH generador de radicales libres 2,2 azo bis-(2-amidino propano) dihidrocloruro, ABTS^{•+} catión radical 2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), DMPD[•] radical N,N-dimetil-p-fenilendiamina, DPPH[•] radical 2,2-difenilo-1-picril-hidrazilo). Sin embargo, no existe el análisis ideal para evaluar el concepto de actividad antioxidante; por ello, se emplean análisis combinados para asistir en la interpretación de los resultados. Inclusive se ha propuesto un índice electroquímico para evaluar la actividad antioxidante.

Cada análisis de AAT se refiere a la actividad de sustancias de bajo peso molecular, pero excluye las contribuciones de las enzimas y de las

proteínas enlazantes de metales. En general, la AAT disminuye en condiciones asociadas con el estrés oxidativo y aumenta con la presencia de antioxidantes que rompen la cadena oxidativa (Young, 2001).

Metabolitos Secundarios

Son productos orgánicos constituyentes de alimentos de origen vegetal (frutas y hortalizas, y alimentos derivados de ellas), que no son nutrientes y que pueden proporcionar al alimento unas propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales propiamente dichas. Dentro de este término genérico, se incluyen sustancias de diversas familias químicas, como son los polifenoles (dentro de los que se incluyen los flavonoides), lignanos, estilbenoides y derivados de ácidos aromáticos, glucosinolatos, compuestos terpenoides (como los carotenoides), entre otros (Rivas y García, 2002).

Metabolitos Secundarios de Moringa sp.

Los metabolitos secundarios son productos químicos producidos por las plantas. Es común referirse únicamente a los productos que pueden tener un impacto en la salud o en el sabor, textura, olor o color de las plantas; sin embargo, estos no son considerados como nutrientes esenciales por el ser humano. Un análisis de los metabolitos secundarios de algunas especies de Moringa podría proveer una oportunidad para examinar una amplia gama de compuestos con diferentes usos y aplicaciones (Muñoz, 2015).

De acuerdo a algunos autores, la familia a la que pertenecen las especies del género *Moringa* es rica en compuestos que contienen el azúcar simple ramnosa, y posee un grupo único de compuestos llamados glucosinolatos y los isotiocianatos (Fahey *et al.*, 2001; Bennet *et al.*, 2003). Además la *M. oleífera* ofrece beneficios que se asocian con metabolitos tales como compuestos fenólicos, vitaminas y proteínas. Las diferentes partes de la planta, incluidas las hojas, tallo, raíces, semillas y flores, son fuente de diferentes compuestos bioquímicos con efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antioxidantes y antimicrobianos. La *M. oleífera* contiene aminoácidos esenciales, carotenoides en las hojas y componentes con propiedades nutraceuticas, lo que apoya la idea de usar esta planta como un suplemento nutricional o un componente en la preparación de alimentos. Los metabolitos secundarios de las hojas de *M. oleífera* han mostrado efectos antimicrobianos contra diversas bacterias patógenas humanas, incluidos los géneros *Shigella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Bacillus* (Torres-Castillo *et al.*, 2013).

Radicales Libres

Los radicales libres oxidan el DNA, lípidos y proteínas, afectando su función y causando mutaciones. El término radical o radical libre, se refiere a cualquier molécula o átomo que contiene al menos un electrón desapareado. En general es muy reactivo hacia otras moléculas, lo que le confiere inestabilidad y vida media muy corta. Así, el radical superóxido o el radical hidroxilo son radicales libres, mientras que el peróxido de hidrógeno no lo es. Por ello, de forma más correcta se las denomina especies reactivas del oxígeno (ROS), aunque también existen las especies reactivas del nitrógeno

(RNS) derivadas del óxido nítrico. La presencia del oxígeno, y especialmente sus especies reactivas derivadas, provocan problemas con los que las células han lidiado a lo largo de la evolución, desarrollando un complejo sistema de defensa antioxidante (Cabiscol, 2014).

Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio entre las moléculas de alto potencial oxidante derivadas del oxígeno (conocidas como especies reactivas del oxígeno) y los sistemas antioxidantes, a favor de la generación de las ERO. La teoría del estrés oxidativo es una de las hipótesis que intenta explicar los cambios degenerativos y la pérdida neuronal que ocurren durante la senescencia. Esta hipótesis considera que el envejecimiento y el desarrollo no son fases distintas de la vida sino más bien que el envejecimiento es la etapa final del desarrollo y que aun cuando no es un fenómeno genéticamente programado ocurre por la influencia del EOx en el programa genético (Rodríguez y Céspedes, 1999).

Definición Operacional de Términos

Extracto: obtenido de una fuente natural o al uso directo de una infusión o una planta. En ellas se encuentra la molécula con actividad biológica y un sin número de otros compuestos (Castillo y Guzmán, 2012).

Fenoles: estos metabolitos secundarios incluyen un numeroso grupo de compuestos que han sido sujetos a una extensiva investigación como agentes preventivos de enfermedades. Los fenoles protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cabo la misma función en el organismo humano (Chasquibol *et al.*, 2003).

Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Polifenoles: corresponden a un grupo de sustancias no enérgicas presentes en los alimentos de origen vegetal y resultan del metabolismo secundario de las plantas. Son un conjunto de moléculas que poseen varios grupos bencénicos en su estructura sustituidos por funciones hidroxílicas (Quiñones *et al.*, 2012).

Carotenoides: esta subclase de terpenos se encuentra en los pigmentos de color amarillo intenso, naranja y rojo de los vegetales como el tomate, la naranja, la yema de huevo, etc. La familia de los carotenoides, incluyen dos tipos de moléculas: carotenos y xantofilas (Chasquibol *et al.*, 2003).

Isotiocianatos: son protectores frente a tumores inducidos por carcinógenos en vejiga, colon, esófago, mama, páncreas y estómago (García, 2011).

In vitro: son procesos realizados en dispositivos de laboratorio utilizando tejidos, células o moléculas provenientes de las especies animales (Fina *et al.*, 2013).

Operacionalización de las Variables

Tabla 2. Operacionalización de las variables de estudio de la presente investigación.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variable
Composición bioquímica	El término composición química se refiere a la determinación del tipo y/o cantidad de compuestos químicos presentes en una muestra, muchos de los cuales pueden tener propiedades beneficiosas para la salud u otras aplicaciones biotecnológicas (Leo, Rivas y García, 2016).	La composición bioquímica se mide mediante los siguientes métodos: * Método de la determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos * Método para la determinación de la Concentración de Proteínas * Método para la determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio.	Cambios de Coloraciones, Lecturas del Espectrofotómetro o Curva de Calibración.	Independiente
Actividad antioxidante	El término antioxidante significa que impide la oxidación de otras sustancias químicas, ocasionada en las reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos. Los antioxidantes actúan suministrando el electrón necesario para completar la capa electrónica externa del radical libre (Leo, Rivas y García, 2016).	La <i>actividad antioxidante</i> se mide mediante los siguientes métodos: * Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo * Método de la Actividad Antioxidante (AOA) * Método del Cation Radical ABTS+•: Ensayo de Decoloración en Solución Etanólica.	Cambios de Coloraciones, Lecturas del Espectrofotómetro o Curva de Calibración.	Dependiente

Fuente: García y Molina, 2019.

Hipótesis de la investigación

Hipótesis de Trabajo

La actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* puede estar correlacionada con su contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas.

Hipótesis Alternativa

La actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* se puede evaluar a través de la descripción detallada de las proteínas antioxidantes presentes.

Hipótesis Nula

La actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* no puede estar correlacionada con el contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

El marco metodológico es el apartado del trabajo que da el giro a la investigación, es donde se expone la manera como se realizó el estudio. Según Buendía, Colás y Hernández (1997) en la metodología se distinguen dos planos fundamentales el general y el específico.

En sentido general, es posible hablar de una metodología de las ciencias aplicables a todos los campos del saber, que recoge las pautas presentes en cualquier proceder científico riguroso con vistas al aumento del conocimiento y/o a la solución de problemas. Atendiendo estas consideraciones, se describirá de manera detallada la metodología que se aplicó en el estudio de la Actividad Antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*.

Tipo de Investigación

Hurtado (2010) define la investigación confirmatoria como aquella que el positivismo ha considerado como la única "científica", y su propósito es verificar las hipótesis derivadas de las teorías. Este tipo de investigación

indaga acerca de las posibles relaciones entre eventos, a partir del control de una serie de variables extrañas. Es por ello, que la presente investigación se fundamenta en confirmar la actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación se define con base en el procedimiento. Es importante no confundir el diseño de investigación con la planificación general de la investigación que abarca las diferentes fases metodológicas. El diseño se refiere a las decisiones que se toman en cuanto al proceso de recolección de datos (y de experimentación en el caso de las investigaciones confirmatorias y las evaluativas), que permitan al investigador lograr la validez interna de la investigación; es decir, tener un alto grado de confianza de que sus conclusiones no son erradas (Hurtado, 2010). Por efecto de esta investigación, el diseño es de campo y de laboratorio, la cual consiste en la recolección de datos directamente de los sujetos investigados, o de la realidad donde ocurren los hechos (datos primarios), sin manipular o controlar variable alguna; es decir, el investigador obtiene la información pero no altera las condiciones existentes (Arias, 2006). Del mismo modo, el estudio de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* se basó en la búsqueda de información en un único evento actual y momento del tiempo desarrollándose un diseño transeccional contemporáneo bivariable y experimental.

Población y Muestra

La población es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación (Arias, 2006). En este sentido, la población seleccionada para el desarrollo de la investigación es el cultivo de las plantas de *M. oleífera*, ubicado en Mesa de Las Palmas, a una altura de 1041 m.s.n.m, latitud de 8°25'5'' y longitud de -71°35'11'' en Santa Cruz de Mora, Estado Mérida.



Figura 1. Ubicación del cultivo de *M. oleífera* donde se tomaron las muestras en estudios. Fuente: Google Maps.

Mientras tanto, Hernández-Sampieri *et al.* (2014) definen la muestra como un subgrupo de la población de interés sobre el cual se recolectarán datos, y que tiene que definirse y delimitarse de antemano con precisión, además de que debe ser representativo de la población. En efecto, para este estudio se utilizaron las hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, de la cual se

obtuvo el extracto metanólico para confirmar la actividad antioxidante que según la literatura posee esta planta.



Figura 2. Planta de *M. oleífera* donde se tomaron las muestras en estudio en Santa Cruz de Mora, Estado Mérida (Venezuela). Fuente: García y Molina, 2019.

Unidad de Investigación

La investigación en desarrollo presentó como unidad de investigación los extractos metanólicos que se obtuvieron de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, para la confirmación de la actividad antioxidante en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra se seleccionó al azar, ya que se recolectó la cantidad suficiente de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, que permitió obtener la cantidad adecuada de extractos metanólicos para la evaluación de la actividad antioxidante que se desea confirmar.

Sistema de Variables

Según Álvarez (citado por Guzmán y Vallenilla 2008) un sistema de variables consiste “en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores o unidades de medida”. Es por ello, que la variable es una característica o cualidad, magnitud o cantidad, que puede sufrir cambios, y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación (Arias, 2006).

Es importante aclarar que la variable independiente de la investigación está sustentada por los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*; mientras que la variable dependiente es definida por la posible actividad antioxidante de *M. oleífera*, cuya propiedad se busca confirmar en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Instrumento de Recolección de Datos

Arias (2006) expone que un instrumento de recolección de datos es cualquier recurso, dispositivo o formato (en papel o digital), que se utiliza para obtener, registrar o almacenar información. Para tal efecto, la recolección de datos de esta investigación se llevó a cabo mediante la aplicación de la observación directa no estructurada sobre la muestra en estudio utilizando como instrumento el diario de campo, cámaras: fotográfica y de video.

Procedimientos de la Investigación

www.bdigital.ula.ve

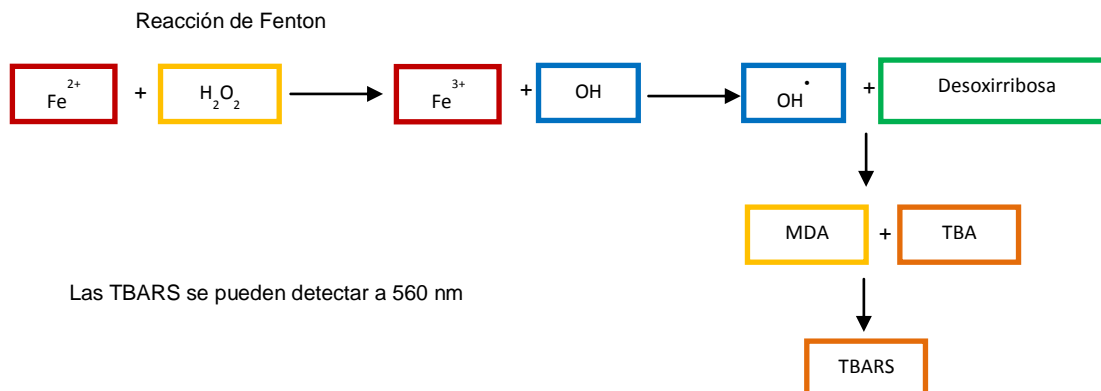
Preparación de la Muestra

Inicialmente se realizó un secado a temperatura ambiente, bajo sombra, por 72 h, seguido de calor a 40 °C en un horno. La pulverización del material seco se realizó con mortero (Castillo *et al.*, 2017). A partir de la sustancia pulverulenta que se obtuvo de las muestras de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* se prepararon extractos metanólicos, los cuales se obtuvieron de la siguiente manera: la muestra seca y molida, luego de pesar una cantidad representativa, fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días divididos en dos ciclos de cinco días. El sobrenadante del extracto metanólico se trasvaso a un tubo limpio; ya que es en este sobrenadante en donde se encuentran los compuestos químicos de interés.

Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo

Se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell *et al.* (1987), el cual se muestra en el Esquema 1. En este método el radical hidroxilo es generado por medio de la reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso oxida al peróxido de hidrógeno para formar la especie $\cdot\text{OH}$. En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa es fragmentada hasta Malondialdehído (MDA) que forma un complejo detectable a 532 nm con el ácido tiobarbitúrico (TBA), conocido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los radicales hidroxilos fueron generados por medio de la reacción de Fenton, la reacción entre iones ferrosos y H_2O_2 en presencia de EDTA y vitamina C, y el MDA determinado por medio del método del TBA. Para una mezcla que contenía 0,1 mL de desoxirribosa 28 mM, se agregaron 0,5 ml de buffer fosfato 40 Mm (pH 7,4), 0,1 mL de FeCl_3 1 Mm, 0,1 ml de EDTA 1,04 Mm, 0,1 mL de H_2O_2 1mM, y 0,1 mL de vitamina C 1 mM, además de 200 μL de cada una de las muestras a ser analizadas. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C, se le agregaron 0,5 ml de TBA 1% en 0,05 M de NaOH y 0,5 mL de ácido tricloroacético 2,8%, y se dejó reaccionar durante 10 min a 100 °C. Se leyó el cambio de absorbancia a 532 nm.



Esquema 1. Representación esquemática método de Halliwell *et al.* (1987) para la medición del Radical Hidroxilo.

Método de la Actividad Antioxidante (AOA)

www.bdigital.ula.ve

El valor de la AOA (Actividad antioxidante) fue determinado por el método de Koracevic *et al.*, (2001). En este método una solución estandarizada de Fe-EDTA reacciona con el peróxido de hidrógeno, produciendo la formación del radical hidroxilo. Este radical libre degrada el benzoato, resultando en la liberación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reacción es monitoreada espectrofotométricamente, y la inhibición del desarrollo de color en presencia antioxidante es definida como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar. Los reactivos preparados fueron los siguientes: (1) Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,4, (2) Benzoato de sodio 10 mM, (3) NaOH 50 mM (0,5 M), (4) EDTA 2 mM en buffer fosfato (solución 1), (5) Fe (NH₄)₂SO₄ 2 mM, (6) solución Fe- EDTA (preparado fresco mezclando iguales volúmenes de las soluciones 4 y 5, y dejando reposar 60 minutos a temperatura ambiente), (7)

H₂O₂ 10 mM, (8) ácido acético 20% (v/v), (9) ácido tiobarbiturico (TBA) 0,8% (p/v) en 50 mM de NaOH, (10) ácido úrico 1 mM en 5 mM de NaOH. Las soluciones 4 y 9 fueron preparadas inmediatamente antes de su uso. El buffer fosfato de sodio y el benzoato de sodio se almacenaron en el refrigerador (0-4 °C) y el ácido úrico en el congelador (-20 a -30 °C).

Cada muestra (A1) debía tener su propio control (A0, muestra blanco) en la cual la mezcla Fe-EDTA y el H₂O₂ fueron agregados después del ácido acético 20%. Para cada serie de análisis se preparó un control negativo por triplicado (K1 y K0), conteniendo los mismos reactivos que A1 o A0 excepto que la muestra antioxidante es reemplazada con buffer fosfato. Los estándares conteniendo 1 mM de ácido úrico (UA1 y UA0) fueron usados para la calibración. Para el análisis se pipetearon en los tubos los volúmenes (en microlitros) especificados en la Tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes necesarios para el Método AOA

	A1	A0	K1	K0	UA1	UA0
Muestra	10	10	-	-	-	-
Ácido úrico	-	-	-	-	10	10
Buffer	490	490	500	500	490	490
Benzoato de sodio	500	500	500	500	500	500
Ácido acético	-	1000	-	1000	-	1000
Continuación tabla 3						
Fe-EDTA	200	200	200	200	200	200
H ₂ O ₂	200	200	200	200	200	200
Incubar por 60 min a 37°C						
Ácido Acético	1000	-	1000	-	1000	-
TBA	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Los tubos se incubaron por 10 minutos a 100 °C en baño de agua, y se enfriaron en baño de hielo. Se midió la absorbancia a 532 nm usando agua destilada como blanco. La actividad antioxidante fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$AOA (mM) = (CUA) * (K - A) / (K - UA), \text{ donde}$$

K= absorbancia del control (K1-K0), A= absorbancia de la muestra (A1-A0), UA= absorbancia de la solución de ácido úrico (UA1-UA0), y CUA es la concentración de ácido úrico (en mM).

Método del Cation Radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en Solución Etanólica.

www.bdigital.ula.ve

Se usó el método desarrollado por Re *et al.* (1999). En este método el ABTS se diluyó en agua a una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS (ABTS^{•+}) se produjo por la reacción de la solución stock de ABTS 7 mM con persulfato de potasio a una concentración final de 2,45 mM (en agua), en oscuridad durante 12-16 h antes de su uso. Para el estudio de compuestos fenólicos, la solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta una absorbancia de 0,70 (±0,02) a 734 nm y 30°C, lo cual se logró mezclando aproximadamente 40 µL de la solución de ABTS y 960 µL de etanol al 20% (v/v). Se tomaron 10 µL de las soluciones stock de antioxidantes fenólicos preparadas en etanol y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro con 1,0 mL de la solución de ABTS^{•+}. Entonces se midieron los valores de densidad óptica a 734 nm 1 min y 6 min después de la mezcla.

Se usó como estándar una solución de 8 mM de Trolox, la cual se diluyó para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8 μM , en buffer PBS 5 mM (pH 7,4) (el cual es usado para antioxidante en extractos metanólicos y para el patrón). Se calculó el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del cation radical ABTS) a 734 nm después de 6 min de reacción y se realizó una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), y se reportó el valor de actividad antioxidante total (AAT) de las muestras problemas en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de AAT para una muestra dada sería el equivalente en concentración de Trolox que produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por lo menos tres veces, para cada una de las muestras y soluciones estándar.

www.bdigital.ula.ve

Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos

El contenido total de polifenoles fue determinado por espectrometría a 765 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Se mezclaron 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en 1/10 con agua, y se le agregaron 400 μL de carbonato de sodio 7,5% (p/v). Se registró la absorbancia después de 10 minutos de reacción a 37 °C, usando como blanco una muestra preparada con agua destilada. La concentración total de polifenoles se determinó usando una curva de calibración usando una solución de 0,1 g/l de ácido gálico como estándar (se prepararon diluciones de 0,025, 0,05 y 0,1 g/l).

Determinación de la Concentración de Proteínas

La determinación de proteínas consistió en una técnica colorimétrica basada en el método de Lowry *et al.* (1961). Primero, se realizó una curva de calibración usando Albumina Bovina (BSA) como estándar [8 mg de BSA en 10 mL de H₂O MQ]. A la solución de BSA se le midió densidad óptica a 279 nm y se le determinó la concentración por medio de la fórmula:

$$[BSA] \text{ (mg/ml)} = D.O._{279 \text{ nm}} \times 13/9$$

Una vez determinada la concentración de la solución estándar, se realizaron las diluciones seriadas necesarias para la construcción de la curva de calibración, de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de reactivos necesarios para la curva de calibración en la determinación de proteínas

Volumen de BSA (μL)	V de agua (μL)	Volumen de Solución C (μL)
0	500	1500
50	450	1500
100	300	1500
200	200	1500

La solución C se preparó mezclando 500 μL de la solución B (sulfato de cobre 4,0%) con 50 mL de la solución A (carbonato de Sodio 2%, hidróxido de sodio 2%, tartrato de sodio y potasio 0,16% y SDS 1 %). Los

tubos de ensayos se colocaron en baño de maría por 10 minutos a 37 °C. Se diluyó un volumen del reactivo de Folin en un mismo volumen de H₂O MQ, y se le adicionaron a cada tubo 150 µL del reactivo de Folin diluido. Los tubos se regresaron al baño de maría por 10 minutos más. Después, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Una vez realizada la curva de calibración se procedió a la medición de las proteínas presentes en las muestras, para lo cual se utilizaron 10 µL de cada una de las muestras a estudiar siguiendo el procedimiento explicado anteriormente.

Determinación del Contenido de Flavonoides: Método colorimétrico del Cloruro de Aluminio.

www.bdigital.ula.ve

El método colorimétrico del cloruro de aluminio se modificó del procedimiento reportado por Woisky y Salatino (1998). En este método, la quercitina fue usada como estándar para construir una curva de calibración, para lo cual diez miligramos de Quercitina se disolvieron en etanol al 80% (v/v), y entonces se diluyeron hasta concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL. Las soluciones estándar diluidas (0,5 mL) se mezclaron por separado con 1,5 mL de etanol al 95% (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1 mL de acetato de potasio 1M y 2,8 mL de agua destilada. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 415 nm. La cantidad de cloruro de aluminio se sustituye por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5 mL de extractos metanólicos de las muestras en estudio se dejaron reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides como se describió anteriormente.

Diseño de Análisis

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y se les aplicaron los tests o pruebas paramétricas, para analizar si los datos se ajustan a una distribución normal, y si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de muestras. Los datos numéricos fueron analizados bajo un diseño cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas. Se hizo un análisis de la varianza, empleando la prueba de ANOVA *post hoc* Scheffé.

Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)

El análisis de varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado (Sote, 2005). El análisis de varianza (ANOVA) de un factor permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa, y se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. La hipótesis nula ($H_0: p \geq 0,05$ Las medias poblacionales son iguales) traducirá la idea de que en los diferentes grupos se obtienen resultados similares y la hipótesis alternativa ($H_1: p < 0,05$ Al menos dos medias poblacionales son distintas) lo negará. La significación del contraste nos dará una idea de si las diferencias observadas en los diferentes grupos son imputables al azar (significación grande) o hay una diferencia intrínseca entre algunos grupos (significación pequeña) (Sote, 2005).

Pruebas *Post-Hoc*.

Una vez que se determinó que existen diferencias entre las medias, las pruebas de rango *post-hoc* y las comparaciones múltiples por parejas permitieron determinar qué medias difieren. Las pruebas de rango son aquellas que buscan identificar grupos homogéneos (medias parecidas). Las comparaciones múltiples buscan establecer diferencias entre grupos basándose en diferencia dos a dos, y generan una matriz donde los asteriscos indican las medias de grupo significativamente diferentes a un nivel alfa de 0,05. En este caso, se llevó cabo la prueba *post-hoc* conocida como Test de Scheffé. Por medio de esta prueba se hacen todas las comparaciones posibles, por ejemplo, el primer grupo con respecto a cada uno de los restantes, pero también el primero con respecto al grupo formado por la unión de dos de los restantes, etc. Posteriormente, es necesario interpretar el nivel de significación, si esta es menor que 0,05, las diferencias entre los grupos formados por la variable en estudio son significativas, allí mismo se observa entre qué grupos exactamente hay diferencias. Si el nivel de significación es mayor o igual a 0,05, no hay diferencias significativas (Blair y Taylor, 2008).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Los extractos metanólicos de *M. oleífera* analizados en este trabajo de investigación, fueron obtenidos de hojas, flores y semillas, de la cual se depositó una muestra testigo en el Herbario MERF Dr. Luis Ruiz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Las muestras son originarias de la Parroquia Mesa de Las Palmas, Municipio Antonio Pinto Salinas Estado Mérida-Venezuela. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, donde se determinó la concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas; además se logró determinar la actividad antioxidante a través de diferentes métodos (Método Radical hidroxilo, ABTS y del AOA). Las distintas determinaciones que se realizaron fueron comparadas con una serie de métodos estadísticos en los cuales se pudo observar la relación entre la concentración de los componentes con la actividad antioxidante que se encontraba presente en la muestra analizada.

Caracterización química de los extractos metanólicos de *M. oleífera*

En la Tabla 5 se observan las concentraciones medias obtenidas de flavonoides, polifenoles y proteínas determinadas en las muestras analizadas a través de diferentes métodos. Para la determinación de flavonoides se utilizó el método colorimétrico del cloruro de aluminio, en el que se utiliza una solución de quercitina como estándar observándose valores de 1779,6, 1383,0 y 73,4mg equivalentes de quercitina/ g de extracto, para hojas, flores y semillas, respectivamente, presentándose el mayor contenido de flavonoides en el extracto metanólico de hojas.

En el caso de la determinación de la concentración de polifenoles, se utilizó una curva de calibración con ácido fólico, obteniendo valores de polifenoles para la hojas de 5,4, flores 1,9 y semillas 0,4 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto; observándose mayor concentración de polifenoles en el extracto de hojas (Tabla 5).

Finalmente, el análisis de la concentración de proteínas consistió en una técnica colorimétrica, donde se realizó una curva de calibración usando albumina bovina como estándar, basándose en método de Lowry *et al.* (1961). En este proceso los resultados arrojados fueron nulos, lo que permite evidenciar que la concentración de proteínas de los extractos analizados en este estudios es cero (Resultado no mostrado).

Tabla 5. Concentración media de flavonoides y grupos fenólicos de las muestras analizadas.

Extracto	Flavonoides (mg equivalentes de quercitina/g de extracto)	Grupos Fenólicos (mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto)
Hojas	1779,6 ± 70,8c	3,4 ± 0,2c
Flores	1383,0 ± 0,0b	1,9 ± 0,2b
Semillas	73,4 ± 1,0a	0,4 ± 0,0a

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P <0.05).

Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *M. oleífera*

www.bdigital.ula.ve

Una vez realizada la caracterización química de los extractos en estudio, se procedió a determinar la actividad antioxidante a través de los métodos AOA, AAT y Radical Hidroxilo. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 6. El método AOA, tiene como finalidad evaluar la actividad antioxidante de una muestra usando como medio de comparación el ácido úrico como estándar, reacción que es monitoreada espectrofotométricamente y que al observarse inhibición en la formación de color indica presencia de antioxidante siendo definida como AOA. Los valores obtenidos en los extractos analizados fueron de hojas 1,00; flores 0,44 y semillas 1,20 mM equivalentes de ácido úrico/g de extracto, observándose el mayor valor de AOA en la semilla. A su vez, se compararon los valores de AOA de los extractos en estudio con antioxidantes comerciales, siendo los valores de AOA de hojas y semillas superiores a los de la quercitina, melatonina y ácido Lipoico; mientras que el valor de AOA de

las flores fue inferior a los 3 antioxidantes comerciales usados en este estudio (Tabla 6). Además, se encontró una correlación positiva entre el contenido de flavonoides ($R^2=0,9997$) y polifenoles ($R^2=0,9126$) con la actividad antioxidante medida a través del método de AOA (Tabla 7).

Tabla 6. Actividad antioxidante de los extractos analizados por los métodos de AOA, radical hidroxilo y AAT.

Extracto	AOA (mM equivalentes de ácido úrico/g de extracto)	Radical Hidroxilo (% de inhibición/g de extracto)	ABTS (μ moles equivalentes de Trolox/g de extracto)
Hojas	1,00 \pm 0,18d	77,7 \pm 4,62e	273,6 \pm 33,4f
Flores	0,44 \pm 0,16a	43,6 \pm 2,72c	110,9 \pm 11,2d
Semillas	1,20 \pm 0,10e	12,8 \pm 0,96a	7,2 \pm 0,8a
Antioxidantes Comerciales (preparados a 1 Mm)			
Quercitina	0,86 \pm 0,03c	53,0 \pm 1,10d	100,6 \pm 1,70c
Melatonina	0,83 \pm 0,02c	53,9 \pm 1,07d	97,6 \pm 5,10b
Ácido Lipoico	0,71 \pm 0,07b	27,9 \pm 0,98b	124,7 \pm 3,10e

Los datos se presentan como media \pm Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P <0.05).

En cuanto a la inhibición del Radical Hidroxilo, se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell *et al.* (1987), encontrándose porcentajes de inhibición de 77,7, 43,6 y 12,8% de inhibición/g de extracto para las hojas, flores y semillas, respectivamente, siendo las semillas el menor de todos. Al compararlo con los antioxidantes comerciales usados, el extracto metanólico de las hojas presentó porcentajes de inhibición

superiores a todos los antioxidantes usados, mientras que los de las flores fueron inferiores a los de la quercitina y melatonina, y superior al ácido lipoico; y las semillas presentó porcentajes de inhibición inferiores a los 3 antioxidantes comerciales usados para comparación (Tabla 6). Al igual que para el método del AOA, se observó una correlación positiva entre el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo y la concentración de flavonoides ($R^2=0,8954$) y polifenoles($R^2=0,9999$) (Tabla 7).

Tabla 7. Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.

Parámetro	Flavonoides	Polifenoles	AOA	RH	CAT
Flavonoides	1	0,9017	0,9997	0,8954	0,8284
Polifenoles		1	0,9126	0,9999	0,9883
AOA			1	0,906	0,842
RH				1	0,990
CAT					1

Por último, se evaluó la actividad antioxidante a través del método catión radical ABTS, con la finalidad de determinar la actividad antioxidante total (AAT), usando como estándar el Trolox, proceso que consiste en secuestrar el catión radical ABTS, observándose la inhibición del desarrollo de color. Se obtuvieron los valores de μ moles equivalentes de Trolox/ g de extracto de 273,6 para las hojas, 110,9 para las flores y 7,2 para las semillas (Tabla 6). Se observó que los valores de AAT de las hojas y semillas son superiores a los de los antioxidantes comerciales usados para comparación, a excepción de las flores en comparación con ácido lipoico; mientras que el valor de AAT de las semillas fue inferior al de todos los antioxidantes

comerciales analizados (Tabla 6). Asimismo, se evidenció una correlación positiva entre el contenido de polifenoles ($R^2=0,9883$) y flavonoides ($R^2=0,8284$) con los valores de AAT (Tabla 7).

Discusión

Caracterización química

M. oleífera Lam. es conocida como una planta con innumerables propiedades nutritivas y terapéuticas, por lo cual pudiera ser considerada como uno de los alimentos que contribuyen al bienestar y a la prevención de enfermedades por sus efectos antioxidantes. Es apremiante su cultivo, utilización y consumo racional, no solo por sus propiedades, sino también como parte de un estilo de vida sano (Ruiz *et al.*, 2012). Es por ello, que esta investigación tuvo como objetivo determinar la composición química y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, con el propósito de confirmar las propiedades que según la literatura esta planta posee, además de aportar a la sociedad mayor información sobre los beneficios que ofrece el consumo de esta planta.

En cuanto a la composición química, el contenido de polifenoles de los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas fue de 3,4; 1,9 y 0,4 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, respectivamente. A su vez, el contenido de flavonoides obtenido para las hojas fue 1779,6, para las flores 1383,0 y para las semillas 73,4 mg equivalentes de quercitina/ g de extracto (Tabla 5).

Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los reportados por Alhakmani *et al.* (2013), donde realizaron la estimación del contenido fenólico total, actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de flores de *M. oleífera*, obteniendo valores de 19,31 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, los cuales son superiores a los reportados por los extractos metanólicos de flores evidenciados en la presente investigación, por lo que se deduce que la ubicación geográfica y la cantidad de muestra pudieron influir en los resultados de los análisis realizados.

Del mismo modo, en un estudio realizado por Pakade *et al.* (2013), compararon la actividad antioxidante de *M. oleífera* y vegetales seleccionados en Sudáfrica, basándose en la determinación del contenido total de fenoles y flavonoides en hojas y flores de la planta de *M. oleífera*. Las concentraciones del contenido de flavonoides totales varió entre 24,0–58,7 g/100 g para hojas, mientras que para las flores fue de 36,1 g/100 g, siendo inferiores a los reportados para flor y hoja en este estudio. En la determinación para el contenido de fenoles totales los resultados reportados para las hojas variaron entre 19,5-31,9 g/100 g y para las flores 29,7 g/100 g, que por el contrario de lo observado en la concentración de flavonoides, resultaron ser inferiores a los observados en la presente investigación.

Otro ejemplo lo constituye el estudio realizado por Vats y Gupta (2017), quienes evaluaron los compuestos bioactivos y potencial antioxidante de extractos hidroetanólicos de *M. oleífera* Lam de Rajasthan, India, resaltando que el mayor contenido de fenoles totales lo poseían las hojas con un valor de 9,58 mg/g y las flores presentaron el mayor contenido de flavonoides totales, siendo este de 3,5 mg/g. Dejando en evidencia, que la muestra de extracto metanólico de flores utilizado en esta investigación presentaron mayor valor en cuanto al contenido de flavonoides totales (Tabla 5).

Un trabajo realizado por Nwidi *et al.*(2018), evaluaron la actividad anti-colinesterasa y antioxidante *in vitro* de extractos de plantas de *M. oleífera*, prepararon extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de diferentes partes de la planta, donde determinaron el contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos etanólicos de semillas, a través de los métodos colorimétricos Reactivo de Folin- Ciocalteu (FCR) y Cloruro de Aluminio, reportando valores para la muestra 1 y 2 de semillas de $146,3 \pm 0,20$; $109,2 \pm 0,80$ mg equivalentes de ácido gálico/g, respectivamente para el contenido de fenoles totales, y $95,3 \pm 2,5$ y $87,2 \pm 3,60$ mg equivalentes de quercetina/g, respectivamente para el contenido de flavonoides totales. Siendo este el estudio con mayor similitud a la presente investigación, debido a que los métodos utilizados fueron los mismos, los contenidos de polifenoles reportados por estos autores son superiores a los encontrados en este trabajo, caso contrario a lo observado para la concentración de flavonoides, siendo superiores las reportadas por este estudio, salvo en el caso de la semilla (Tabla 5).

En cuanto a la concentración de proteínas, en esta investigación no fueron medibles las concentraciones de proteínas de los extractos de hoja, flor y semilla de *M. oleífera* (Resultado no mostrado). Esto contrasta con los resultados reportados por Castillo *et al.* (2017), quienes caracterizaron nutricionalmente extractos de *M. oleífera*, encontrando contenidos de proteínas en extractos de hojas entre 31,69 y 36,83%.

Finalmente, el análisis químico de los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* es de gran importancia, ya que el objetivo es presentar las evidencias aportadas por la literatura científica que confirman y explican las propiedades y aplicaciones de la Moringa, las cuales se distancian de versiones sin confirmar aportadas por la literatura popular y la publicidad (Martín *et al.*, 2013).

Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos

Los antioxidantes son compuestos de gran interés en la actualidad por sus benéficas aplicaciones para la salud humana. Dado que existe un marcado interés en la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales (Echavarria *et al.*, 2009), este estudio se fundamentó en la determinación de la actividad antioxidante presente en los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*.

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos fue evaluada a través de tres métodos: AOA, % de inhibición del radical hidroxilo y ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{•+}. En el caso del método del AOA se obtuvieron valores para el método 1,00; 0,44 y 1,20 mM equivalente de ácido úrico/g de extractos de hojas, flores y semillas, respectivamente. Por otra parte, el % de inhibición del radical hidroxilo arrojó valores para los extractos metanólicos de hojas 77,7; flores 43,6 y semillas 12,8 % de inhibición/g de extracto. Del mismo modo, la determinación de AAT mediante el método ABTS^{•+} expresó valores de 273,6; 110,9 y 7,2 μ Moles equivalentes de Trolox/g de extracto de hojas, flores y semillas, respectivamente (Tabla 6). Es de importancia mencionar, que este estudio demostró una fuerte correlación positiva entre el contenido de polifenoles y flavonoides con la actividad antioxidante medida a través de los 3 métodos elegidos (Tabla 7).

En el estudio realizado por Jaiswal *et al.* (2013), evaluaron la aplicación de la *M. oleífera* en la regulación del estrés oxidativo inducido por la diabetes, donde emplearon el ensayo de Potencial Reductor Férrico (FRAP) para la evaluación de la actividad antioxidante, obteniendo como resultado del ensayo FRAP de las hojas de *M. oleífera* un valor de $85,00 \pm 5,00$ μ Moles de Fe⁺⁺/g de extracto en polvo. A pesar de que el método

empleado fue diferente al utilizado en este estudio, ambos permitieron determinar la correlación que existe entre el contenido de fenoles y flavonoides y la actividad antioxidante, lo que otorga una actividad antioxidante significativa.

Asimismo, Wright *et al.*(2017) investigaron la capacidad antioxidante de extractos de *M. oleífera*, preparando extractos de hojas secas y molidas con etanol/agua (4:1) empleando para el respectivo análisis el ensayo de 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH); reportando valores para los extractos que variaron entre 177 y 4458 $\mu\text{g/ml}$. Los extractos preparados con solventes polares tenían un potencial antioxidante significativamente mayor. A su vez, resaltaron que la actividad antioxidante en muestras de *M. oleífera* en diferentes partes del mundo tiene distintos rangos de valores. Esto explica porque los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera* utilizados en esta investigación presentaron una elevada actividad antioxidante, lo que se puede asociar al tipo de solvente utilizado o a la ubicación geográfica del cultivo de *M. oleífera*.

En otra investigación realizada por Ogbunugafor *et al.* (2011), determinaron la concentración de fenoles totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante total en aceite de semillas de *M. oleífera*, arrojando los siguientes resultados, para fenoles totales $40,17 \pm 0,01$ mg de ácido gálico/g de muestra (mg GAExg^{-1}); flavonoides totales $18,24 \pm 0,01$ mg equivalentes de rutina/g de muestra (mg RExg^{-1})y capacidad antioxidante total de $37,94 \pm 0,02$ mg equivalentes de ácido ascórbico/g de muestra (mg AAE g^{-1}), utilizando el método de fosfomolibdeno descrito por Nabasree y Bratati (2007) para la determinación de la capacidad antioxidante, lo que indica que existe correlación entre el contenido de flavonoides, fenoles y la actividad antioxidante, al igual que en el presente trabajo donde las muestra utilizadas fueron extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, aún cuando se utilizó un método diferente.

En el trabajo llevado a cabo por Yan *et al.* (2019) se evaluó el contenido fisicoquímico, actividad antioxidante (a través del método del ABTS) y antibacteriana de extractos en acetona de hojas de *M. oleífera*, encontrando contenido de polifenoles de 20,16 mg de ácido gálico/g de extracto, la identificación de 39 compuestos a través de espectrometría de masas, una elevada actividad antioxidante, y actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. A semejanza de la presente investigación se encontró una fuerte correlación positiva entre el contenido de polifenoles y las bioactividades reportadas en la investigación. Así mismos, Xu *et al.* (2019) evaluaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de hojas, semillas y raíces de *M. oleífera* de Kenia, y las correlacionaron con los constituyentes de estas partes de la planta. Los resultados mostraron que los extractos de hojas presentaron los mayores valores de actividad secuestrante de DPPH y FRAP, mientras que los de semilla presentaron los mayores valores de actividad secuestrante del catión radical ABTS, encontrando en todos los casos una fuerte correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de flavonoides, concluyendo que las hojas de *M. oleífera* son una fuente excelente de antioxidantes naturales muy prometedores para el desarrollo de suplementos dietéticos promotores de la salud.

La revisión de la literatura permite observar que los valores de actividad antioxidante y contenido de polifenoles y flavonoides de diferentes extractos de *M. oleífera* varían de acuerdo al solvente utilizado y a la ubicación geográfica de la planta. En lo que se refiere al solvente utilizado para la extracción, Nobossé *et al.* (2018) llevaron a cabo la evaluación de la actividad antioxidante y contenido fitoquímico de hojas de *M. oleífera* en función de la edad de la planta y el solvente de extracción, para lo cual tomaron hojas de *M. oleífera* de 40, 45 y 60 días de edad extraídas con metanol, etanol, y agua. La actividad antioxidante la midieron usando los

métodos del DPPH, ABTS, actividad antiperóxido, y FRAP, y la correlacionaron con la concentración de polifenoles y flavonoides totales. Encontraron una variabilidad significativa ($p < 0,05$) en los valores de actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales en relación con la edad y el solvente de extracción, concluyendo que las concentraciones de polifenoles y flavonoides incrementan con la madurez de la planta, a excepción de los extractos acuosos. Las hojas de 60 días de edad presentaron los mayores valores de actividad antioxidante y concentraciones de flavonoides y polifenoles. En cuanto al solvente utilizado para llevar a cabo la extracción, el metanol fue el solvente con el que se obtuvo la mayor concentración de polifenoles (4,6 mg ácido gálico/g de extracto), mientras que la concentración de flavonoides fue mayor con etanol (1,8 g equivalentes de quercitina/g de extracto); mientras que la actividad antioxidante fue mayor con metanol que con etanol. En conclusión, la actividad antioxidante de hojas frescas de *M. oleífera* está influenciada por su contenido de metabolitos secundarios y por la edad de la planta. El mismo efecto fue reportado por Rocchetti *et al.* (2020) quienes evaluaron el perfil de polifenoles y actividad antioxidante de hojas de *M. oleífera* usando como solventes metanol, metanol-agua (50:50% V/V) y etil acetato, reportando el mayor contenido de polifenoles (31,84 mg/g) en metanol, y los mayores valores de DPPH y ABTS (49,55 y 45,26 mgTE/g) para los extractos obtenidos usando la mezcla metanol-agua.

En cuanto a la ubicación geográfica, se ha llevado la determinación de la concentración de polifenoles y flavonoides, y actividad antioxidante de extractos de hojas de moringa provenientes de diferentes partes del mundo, usando los mismos métodos utilizados en el presente trabajo de investigación, tal es el ejemplo de extractos de plantas de moringa de Jamaica (Wright *et al.*, 2017), de Kenia (Xu *et al.*, 2019) y Nigeria (Nwidu *et al.*, 2018). En cada caso los valores de los parámetros expresados anteriormente son muy diferentes, concluyendo que los mismos dependen de

las condiciones ambientales, tipo de suelo, clima, y otros factores típicos del lugar de origen de la planta (Wright *et al.*, 2017).

Los resultados encontrados en este trabajo demuestran que los extractos de hojas, flores y semilla de *M. oleífera* colectada en Mérida (Venezuela) poseen altas concentraciones de polifenoles y flavonoides, responsables de la elevada actividad antioxidante medida a través de 3 métodos diferentes, pudiendo ser considerada sola o en conjunto con otros métodos como fuente de antioxidantes para el tratamiento de patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Ejemplo de esto lo constituye el trabajo realizado por Hagoel *et al.* (2019) quienes investigaron el efecto de moringa, sola o combinada con radiación en la supervivencia de células de cáncer pancreático y en el crecimiento tumoral, concluyendo que moringa disminuyó la supervivencia, actividad metastásica y crecimiento tumoral de células cancerígenas, y que la combinación de moringa con la radiación resultó en un efecto inhibitorio adicional que proporciona las bases para futuras investigaciones acerca de este novedoso tratamiento. También podrían usarse extractos de *M. oleífera* en combinación con otras plantas con actividades curativas, tal es el caso del trabajo realizado por Abdul-Hisam *et al.* (2018) quienes determinaron la actividad antioxidante combinada de extractos de *M. oleífera* y *Centella asiática* y su efecto en el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en fibroblastos, concluyendo que la combinación de ambos extractos resultó ser más efectiva que los extractos de manera individual.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La concentración de polifenoles, reportada como mg equivalentes de ácido gálico/gramos de extracto, fue de 3,4 para las hojas, 1,9 para las flores y 0,4 para las semillas.
- La concentración de flavonoides obtenida en los extractos de hojas, flores y semillas fue de 1779,6; 1383,0 y 73,4 mg equivalentes de quercitina/ gramos de extracto, respectivamente.
- No se logró determinar la concentración de proteínas de los extractos metanólicos de las muestras en estudio, siendo reportados como cero.
- Los valores de AOA, medidos como mM equivalentes de ácido úrico/g de extracto, fueron de 1,00 para las hojas, 0,44 para las flores, y 1,20 para las semillas; los valores de % de inhibición de radical hidroxilo/ g de extracto fueron de 77,7, 43,6 y 12,8 para hojas, flor y semillas, respectivamente. Por último, los valores de AAT (μ moles equivalente de Trolox/ g de extracto) fueron 273,6 para las hojas, 110,9 para las flores y 7,2 para las semillas.
- Se obtuvo una elevada correlación positiva entre la concentración de flavonoides y polifenoles y la actividad antioxidante medida a través de los tres métodos usados en este estudio.

- De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, se deduce que esta planta posee alto contenido de metabolitos secundarios que le pudieran otorgar algún tipo de actividad terapéutica.

Este es el primer estudio donde se realiza un análisis formal de la actividad antioxidante y contenidos de polifenoles, flavonoides y proteínas de extractos metanólicos de hoja, flor y semilla de *M. oleífera* proveniente de Mérida (Venezuela), contribuyendo significativamente con el conocimiento de la especie así como de sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Recomendaciones

www.bdigital.ula.ve

- Para una mejor evaluación de la composición química y actividad antioxidante, se sugiere incrementar el número de muestras a analizar.
- Realizar la comparación de la actividad antioxidante y análisis químico de muestras de *M. oleífera* obtenidas en distintas localizaciones geográficas, y con extractos llevados a cabo con diferentes solventes.
- Aplicar un método diferente al método de Lowry *et al.* (1961) para la determinación de la concentración de proteínas, de tal manera que se puedan obtener valores que permitan su inclusión en la evaluación de la composición química de los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*.
- Se sugiere la realización de estudios basados en la determinación de los tipos de compuestos fenólicos y de flavonoides presentes en las

muestras de extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, pudiendo de esta manera evaluar si las diferencias de concentración se deben a los distintos polifenoles y flavonoides que contienen estas muestras.

- Realizar estudios sobre la actividad terapéutica presente en los extractos metanólicos de hojas, flores y semillas de *M. oleífera*, específicamente sobre la actividad antibacteriana.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abdul-Hisam EE, Rofiee MS, Khalid AM, Jalaluddin AF, Mohamad Yosof MI, Idris MH, Ramli S, James RJ, Jack Yoeng W, Lay Kek T, Salleh MZ. (2018). Combined extract of *Moringa oleifera* and *Centella asiatica* modulates oxidative stress and senescence in hydrogen peroxide-induced human dermal fibroblasts. *Turkish Journal of Biology* 42: 33-44.
- Alhakmani, F., Kumar, S., Khan, S., (2013). Estimation of total phenolic content, *in-vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(8): 623-627.
- Arias F. (2006). El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica. Editorial EPISTEME. Caracas- Venezuela.
- Atawodi SE, Atawodi JC, Idakwo GA, Pfundstein B, Haubner R, Wurtele G, *et al.* (2010). Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks of *Moringa oleifera* Lam. *US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed.gov)*. 13(3):710-6.
- Avila M, Crevillen A, Gonzales M, Escarpa A, Hortiguera L, Carretero C. (2006). Electroanalytical approach to evaluate antioxidant capacity in honeys: Proposal of an antioxidant index. *Electroanalysis*. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices* 18(18):1821-1826.
- Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, Kroom PA. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish

- Tree) and *Moringa stenopetala* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(35): 463–553.
- Blair, C. y Taylor R. *Bioestadística. Florida*: Editorial Peason Prentice Hall.
- Buendía, Colás y Hernández (1997). Competencias científicas para la realización de una tesis doctoral. La Coruña: Davinci Continental.
- Cabiscol, E.. (2014). Oxidación Celular y Envejecimiento. Radicales Libres. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).
- Cabrera, J. (2014). Evaluación del contenido de alcaloides, flavonoides, taninos y aceites esenciales en 3 estados de maduración y recolección de la *Moringa oleífera*. Universidad Técnica de Machala.
- Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R. y Bravo, M. (2003). Alimentos Funcionales o Fitoquímicos, Clasificación e Importancia. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 5(2):9-20.
- Castillo, P. y Guzmán, S. (2012). Medicamentos, productos químicos para la salud. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castillo, A., Molinares, P., Campo, M. y Bettin, A. (2017). Actividad Antibacteriana del Extracto Total de hojas de Cucurbita moschata Duchesne (Ahuyama).Revista Cubana de Plantas Medicinales (Scielo).22(1).
- Castillo, R., León, J., Angulo, M., Gutiérrez, R., Muy, M., Heredia, J., (2017). Nutritional and Phenolic characterization of *Moringa oleífera* leaves grown in Sinaloa, México. Pak. J. Bot., 49(1): 161-168.
- Castro, L., Ventura, S., González, H., Rojas, R., Ascacio, V., Aguilar, C. y Martínez, A. (2017). Impact techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. Química de Alimentos (PubMed.gov). 237.
- Doménech, G., Durango, A. y Ros, G. (2017). Moringa oleífera: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos.Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.67(2).

- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. y Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 56: 5 –51.
- Fahey, J. y Olson, M. (2011). Moringa oleífera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82(4), 1071-1082.
- Fina *et al.*, (2013). ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico?. *Actualizaciones en Osteología*. 9(3).
- Fuglie, L. J. (1999). The miracle tree: Moringa oleífera: Natural nutrition for the Tropics. Church World Service, Dakar. 68 pp.
- García, A. (2011). Efecto protector de los isotiocianatos y organosulfurados solos o en combinación con la Vitamina C frente al daño al DNA inducido por la n-nitrosopiperidina y la n-nitrosobutilamina: mecanismos de acción. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, VK., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R., et al., (2012). Evaluación of antidiabetic and antioxidant activity of Moringa oleífera in experimental diabetes. *US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed.gov)*. 4(2):164-71.
- Guzmán, M. y Vallenilla, E. (2012). Análisis y Síntesis de los Cursos Especiales de Grado. Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui-Venezuela.
- Hagoel L, Vexler A, Kalich-Philosoph L, Earon G, Ron I, Shtabsky A, Marmor S, Lev-Ari S. (2019). Combined Effect of *Moringaoleifera* and Ionizing Radiation on Survival and Metastatic Activity of Pancreatic Cancer Cells. *Integrative Cancer Therapies* 18: 1–11.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1999). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York.

- Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O (1987). The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*.
- Hernández-Sampieri., Fernández-Collado R., Baptista-Lucio C., Pilar. (2014) *Metodología de la investigación*. 5a ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hurtado Barrera (2010). *Metodología de la Investigación: guía para una comprensión holística de la ciencia*. 4ª. Ed. Caracas: Quirón Ediciones.
- Jaiswal, D., Kumar, P., Mehta, S., Chatterji, S., Shukla, S., Kumar, D., Sharma, G., Sharma, B., Khair, S., Watal, G., (2013). Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 426-432.
- Jarrín, J. (2018). Actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Moringa oleifera* al 25% 50% 75% y 100% sobre cepas de *Cándida albicans*. Estudio in vitro. Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V: Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001.
- Lamou, B., Taiwe, G., Hamadou, A., Houllay, J. y Atour, M. (2016). Antioxidant and Antifatigue Properties of the Aqueous Extract of *Moringa oleifera* in Rats Subjected to Forced Swimming Endurance Test. *Oxid Med Cell Longev*. US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed.gov).
- Lim, T.K.(2012). *Moringa oleifera*: Edible Medicinal and Non- Medicinal Plants. 3: 453–455.
- Llancari A, Matos A. (2011). Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. En: Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. Perú, Lima.

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1961. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Martín C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleífera*. *Pastos y Forrajes, Matanzas (Scielo)*. 36(2)150-158.
- Martínez-Flórez, S., Gonzalez- Gallego, J., Culebras, J. y Tuñón, M. (2002). Los Flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6) 271-278.
- Muñoz, A. (2015). Desarrollo de un Sistema de propagación in vitro y transformación genética en plantas de *Moringa* (*Moringa oleífera* Lam). (Tesis de maestría). Universidad autónoma de Aguas calientes, AGS.
- NobosséP, FombangEN, Mbofung C.(2018). Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh *Moringa oleífera* L. leaves. *Food Science and Nutrition* 6: 2188-2198.
- Nwidu, L., Elmorsy, E., Aprioku, J., Siminialayi, I., Carter, W., (2018). In Vitro Anti-Cholinesterase and Antioxidant Activity of Extracts of *Moringa oleífera* Plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria. *Medicines* 5,71.
- Ogbunugafor, HA., Eneh, FU., Ozumba, AN., Igwo-Ezikpe, MN., Okpuzor, J., Igwilo, IO., Adenekan, SO. and Onyekwelu, OA (2011). Physico-chemical and Antioxidant Properties of *Moringa oleífera* Seed Oil. *Pakistan Journal of Nutrition*. 10(5): 409-414.
- Pakade, V., Cukrowska, E. and Chimuka, L., (2013). Comparison of antioxidant activity of *Moringa oleífera* and selected vegetables in South Africa. *South African Journal of Science*. 109(3/4).
- Palada MC. (1996). *Moringa* (*Moringa oleífera* Lam): A versatile tree crop with horticultural potential in the subtropical United States .*HortScience* : American Society for Horticultural Science (USA). 31(5):794-797.

- Pérez A, Sánchez T, Armengol N, Reyes F. (2010). Características y potencialidades de *Moringa oleífera*, Lamark: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes, Matanzas (Scielo)*. 33(4).
- Quintanar M, Calderón J. (2009). La capacidad antioxidante total. *Bases y Aplicaciones. Rev. Educación Bioq.* 28 (3):89-101.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los Polifenoles compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el Sistema Cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria(Scielo)*. 27 (1).
- Re Robertare, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth pannala, Min Yang, and Catherine Rice-evans. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved abts Radical Cation deColorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.
- Reyes A, Galicia M, Carrillo M. (2011). Antioxidantes:la magia de lo natural. *Rev Tlatemoani*. 8: 1-16.
- Rice-Evans, C., Miller, NJ., Bolwell, PG., Bramley, PM. and Pridham, JB., (1995). The relative antioxidant properties of plant-derived polyphenolic flavonoids. *US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed.gov)*. 22(4):375-83.
- Rivas , G. y García, A. (2002). Flavonoides en Alimentos Vegetales: Estructura y Actividad Antioxidante. *Alimentación, nutrición y salud(ANS)*. 9(2):31-38
- Rocchetti G, Pagnossa JP, Blasi F, Cossignani L, HilsdorfPiccoli R, Zengin G, Montesano D, Coconcelli PS, Lucini L. (2020).(1999). Phenolic profiling and in vitro bioactivity of *Moringaoleifera* leaves as affected by different extraction solvents. *Food Research International*. 127: 108-112.
- Rodríguez, K. y Céspedes, E. (1999). Estrés Oxidativo y Envejecimiento . *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas(Scielo)*. 18 (2).

- Rodríguez, J. (2018). Árbol de '*Moringa oleífera*': una mirada a sus propiedades y aplicaciones. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. Milenio Diario.
- Ruiz, R., Rivera, R. y Bolívar, M., (2012). *Moringa oleífera*: una opción saludable para el bienestar. MEDISAN. 16(10): 1596.
- Sampson, W. (2005). Studying herbal remedies. New England Journal of Medicine. (Scielo). 353:337–339.
- Sánchez-Cordova, A., Alcantara-Cuevas, H., Magdaleno, V., Paniagua-Vega, D., Capataz-Tafur, J. y Huerta-Heredia, A.(2015). Evaluación de la Actividad Antioxidante de Extractos crudos de raíz y hoja de *Moringa oleífera* crecidas en el invernadero del ITSTB.XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara.
- Santos-Buelga, C. y Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80(7): 1094-1117.
- Santos-Buelga, C. y Tomás- Barberán, F. (2001). Sustancias Fitoquímicas de Frutas y Hortalizas, su posible papel beneficioso para la Salud.DIGITAL.CSIC. CEBAS Artículos.
- Singh, R., Negi, P. y Radha, C. (2014).Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringaoleifera* seed flour. Journal of Functional Foods. 5(4).
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299:152–178.
- Sreelatha S, Padma PR. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleífera* leaves in two stages of maturity.US

- National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed.gov). 64(4):303-11.
- Sote A. (2005). Principios de Estadística. Editorial Panapo de Venezuela. Caracas. pp. 143.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2003). Plant physiology. US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed.gov). 91(6): 750-751.
- Talalay, P. y Talalay, P. (2001). The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. Academic Medicine 76:238–247.
- Tee, ES., Noor, MI., Azudin, MN. y Idris K. (1997). Nutrient composition of Malaysian foods. Institute for Medical Research. Revista Kuala Lumpur. 299.
- Torres-Castillo, JA., Sinagawa-García, SR., Martínez-Ávila, GCG., López-Flores, AB., Sánchez-González, EI., Aguirre-Arzola, VE., RI Torres-Acosta, RI., Olivares-Sáenz, E., Osorio-Hernández, E. y Gutiérrez-Díez, A. (2013). *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. International Journal of Experimental Botany. 82: 193-202.
- Tumer, TB., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Raskin, I. and Waterman, C., (2015). Direct and Indirect Antioxidant Activity of Polyphenol- and Isothiocyanate-Enriched Fractions from *Moringa oleifera*. J Agric Food Chem. 63(5):1505-13.
- Vats, S. and Gupta, T., (2017). Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. From Rajasthan, India. Physiol Mol Biol Plants. 23(1): 239-248.
- Velázquez-Zavala, M., Peón-Escalante, Y., Zepeda-Bautista, R. y Jiménez-Arellanes, M. (2016). *Moringa (Moringa oleifera Lam)*: Potential uses in agriculture, industry and medicine. Revista Chapingo. Serie horticultura (Scielo). 22(2): 95-116.

- Villareal, A. y Ortega, K. (2014). Revisión de las Características y uso de la planta *Moringa oleífera*. Investigación&Desarrollo (redalyc.org). 22(2): 309-330.
- Wright, R., Lee, K., Hyacinth, H., Hibbert, J., Reid, M., Wheatley, A., Asemota, H., (2017). An Investigation of the Antioxidant Capacity in Extracts from *Moringa oleifera* Plants Grown in Jamaica. 6-48.
- Woisky, R. and Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apic. Res. 37: 99-105.
- Xu YB, Chen GL, Guo MQ. (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Crude Extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. Antioxidants 8: 8-19.
- Yan G, Liping S, Yongliang Z.(2019). UPLC-Q-Orbitrap-MS² analysis of *Moringaoleifera* leaf extract and its antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities. Natural Products Research 10: 147-158.
- Yang, R.Y., Lin, S. y Kuo, G. (2008). Analysis Content and Distribution of Flavonoids among 91 edible plant species.Asia Pac J. Clin Nutr. 17(51): 275-279.
- Young, IS. (2001). Measurement of total antioxidant capacity. J Clin Pathol. 54 (5): 339-40.
- Zapata, L., Gerard, L., Davies, C. y Schvab, M. (2007). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. Ciencia, docencia y tecnología (Scielo). n.35: 175-193.

www.bdigital.ula.ve