

Universidad de Burgos  
Facultad de Ciencias  
Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos  
Área de Ingeniería Química



# **EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJA DE MORINGA**

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Dirigido y tutorizado por:

Dra. María Teresa Sanz Díez y Dr. Óscar Benito Román

Memoria presentada por:

Lucía Gómez González

Febrero 2020

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL  
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**CURSO: 2019-2020**

Dña. María Teresa Sanz Diez y D. Óscar Benito Román informan de que el alumno Dña. Lucía Gómez González, ha realizado el trabajo "Extracción de compuestos bioactivos en hoja de Moringa" bajo su tutela, y consideran que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO \*

(\* En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 19 de febrero de 2020



Fdo.: María Teresa Sanz Diez



Fdo.: Óscar Benito Román

**ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU**

Dña. María Teresa Sanz Diez y D. Óscar Benito Román y Dña. Lucía Gómez González, autor y tutores del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 19 de febrero de 2020



Fdo.: María Teresa Sanz Diez



Fdo.: Óscar Benito Román



Fdo.: Lucía Gómez González

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de Investigación VALORIZACIÓN INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA MEDIANTE TECNOLOGÍAS EMERGENTES (ALVALOR) financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU301P18) y desarrollado en el Grupo de investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	0
ABSTRACT .....	0
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Moringa Oleífera y sus propiedades. ....	1
1.2 Métodos de extracción .....	2
2. OBJECTIVES.....	4
3. METODOLOGÍA.....	4
3.1 Materia prima.....	4
3.2 Procedimiento de extracción de la hoja de Moringa .....	4
3.2.1 Extracción de hoja de Moringa mediante técnica convencional .....	4
3.2.2 Extracción asistida por ultrasonido (UAE) de hoja de Moringa. ....	5
3.2.3 Extracción de hoja de Moringa mediante PLE (Extracción líquida presurizada).....	5
3.3 Métodos de caracterización de la hoja de Moringa.....	6
3.3.1 Polifenoles totales.....	6
3.3.2 HPLC (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento) .....	7
4. RESULTADOS.....	8
4.1 Comparación entre extracción convencional y asistida con ultrasonidos .....	8
4.2 Efecto del disolvente .....	10
4.3 Efecto de la relación soluto-disolvente.....	12
4.4 Efecto de la temperatura en la extracción convencional.....	14
4.5 Extracción de compuestos fenólicos totales de la hoja de Moringa mediante agua presurizada (PLE).....	16
4.6 Identificación de compuestos fenólicos.....	17
5. CONCLUSIONES .....	19
6. BIBLIOGRAFÍA.....	20

## RESUMEN

La *Moringa oleifera* es una planta considerada como una de las más útiles y con múltiples beneficios. Se utiliza como materia prima en diferentes industrias, como la alimentaria, farmacéutica y cosmética. Una de sus características distintivas es que en sus hojas se acumulan altos contenidos de compuestos fenólicos, los cuales se investigan por sus propiedades biológicas. Este trabajo se realiza con el objetivo de extraer los polifenoles totales presentes en la hoja de Moringa. La extracción se realizó mediante diferentes técnicas, como la extracción convencional con agitación mecánica, la extracción asistida por ultrasonidos y la extracción con agua presurizada. Además se estudia el efecto de diferentes variables, como la temperatura, el disolvente utilizado y la relación soluto-disolvente. Los mayores rendimientos de extracciones de polifenoles se obtuvieron con el método de extracción asistida por ultrasonidos con agua como disolvente a 50 °C y relación soluto-disolvente de 1g de hoja de Moringa por 10 ml de disolvente (42,51 mg equivalentes a. gálico /g de hoja seca), y con el método de extracción convencional con agitación magnética utilizando como disolvente una mezcla hidroalcohólica al 20% de etanol, a las mismas condiciones de temperatura y relación soluto-disolvente que en el otro método (41,53mg equivalente a. gálico/g de hoja seca). Por último, se identificaron mediante la técnica de HPLC algunos de los compuesto fenólicos presentes en la hoja de *Moringa oleifera*.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* is one of the most useful and multi-profit plant. It is used as a raw material in different industries, such as food, pharmaceutical and cosmetics. One of its distinctive features is that its leaves accumulate high contents of phenolic compounds, which are investigated for their biological properties. This work is done with in order to extract the total polyphenols present in the Moringa leaf. The extraction was performed using different techniques, such as conventional extraction with mechanical agitation, ultrasonic assisted extraction and pressurized water extraction. In addition, the effect of different variables is studied, temperature, the solvent used, and the solute-solvent ratio. The greatest polyphenol extractions are obtained with the ultrasonic assisted extraction method at 50 °C and solute-solvent ratio of 1 g Moringa leaf per 10 ml solvent (42,51mg eq gallic acid/g dried leaf), and with the conventional extraction with magnetic agitation method using as solvent a hydroalcoholic mixture of 20% ethanol, at the same temperature and solute-solvent ratio conditions as in the other method. (41,53mg eq a.gálico /g dried leaf). Finally, some of the phenolic compounds present in the *Moringa oleifera* leaf were identified by the HPLC technique.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Moringa Oleifera y sus propiedades.

La *Moringa Oleifera* es una planta perteneciente al género monogénico Moringa de la familia Moringaceae. Es originaria de la India, Indonesia, Sri Lanka y en los últimos tiempos se ha introducido en países africanos y países centroamericanos. Esta planta puede alcanzar una altura de 10 a 12 metros, tiene una copa en forma de sombrilla, raíces profundas, corteza grisácea con apariencia de corcho y ramas frágiles. Presenta flores fragantes de color crema y sus frutos están conformados por una cápsula de tres válvulas (Figura 1). (Tobias, 2010)



Figura 1. Moringa Oleifera. (*Moringa oleifera* - Horseradish Tree PKM2 - Seeds, n.d.). Recuperado de: <http://www.tradewindsfruit.com/moringa-oleifera--seeds>

La *Moringa oleifera* se ha definido como un árbol de usos múltiples, todas las partes de la planta se utilizan para diferentes propósitos. Se utiliza en nutrición humana, nutrición animal y en medicina tradicional para el tratamiento de muchas enfermedades. (Vats & Gupta, 2017)

Las hojas de *M. oleifera* poseen el mayor **contenido de fenólicos totales**,  $\beta$  – caroteno y licopeno de la planta. Mientras que las flores y la corteza tienen el mayor contenido de flavonoides y antocianina. Los principales constituyentes son epiglobulol (42% en corteza), fitol (24% en hoja) y  $\beta$  – sitosterol (15% en flor). Los fitoquímicos identificados en esta planta poseen actividades terapéuticas, entre las que se incluye el **potencial antioxidante**. (Leone et al., 2015). Los antioxidantes desempeñan un papel importante en la inhibición y eliminación de los radicales libres, brindando protección a los humanos contra infecciones y enfermedades degenerativas. La falta de terapias efectivas para la mayoría de las enfermedades crónicas y el aumento de interés en la biología de los radicales libres están aumentando el uso de los antioxidantes en la protección contra estas enfermedades. (Karthivashan et al., 2013) Los antioxidantes naturales, especialmente los fenólicos y flavonoides, son seguros y bioactivos. La *Moringa Oleifera* es la mayor fuente de antioxidantes entre los recursos alimenticios naturales y se utiliza en una amplia gama de diversas dolencias. (Sreelatha & Padma, 2009)

Casi todas las partes de esta planta son usadas en la **medicina tradicional**. La raíz, la corteza, la hoja, las flores, la semilla y el aceite de semilla se utilizan para el tratamiento de la inflamación y las enfermedades infecciosas. (Karthivashan et al., 2013).

La *Moringa Oleifera* posee además del gran rango de usos medicinales, un **alto valor nutricional**. Contiene la mayor parte de los aminoácidos esenciales, además de minerales en cantidades significativas. Las hojas son ricas en proteínas, calcio, hierro, potasio, vitaminas

(particularmente C y E),  $\beta$ -caroteno y en compuestos antioxidantes y bioactivos (flavonoides, ácidos fenólicos, glucosinolatos, taninos y saponinas. (Guaycha Pérez et al., 2017). Estas características hacen que la planta sea adecuada para ser utilizada en la lucha contra la desnutrición y como planta medicinal en países subdesarrollados y en desarrollo. (Leone et al., 2015)

Contiene algunos compuestos con **actividad farmacológica** documentada, como los ácidos salicílico y ferúlico. El ácido salicílico se conoce principalmente como el principal metabolito y componente activo de la aspirina. El ácido ferúlico posee diversas propiedades fisiológicas, como la inhibición de la promoción de tumores, la reducción de los perfiles séricos y de lípidos hepáticos (principalmente el colesterol total), la reducción del nivel de triglicéridos y una acción protectora contra la lesión hepática. (Leone et al., 2015)

Esta planta es también rica en glucosinolatos e isotiocianatos, contiene alcaloides como la Moringinina y Moringina. Las flores contienen pigmentos tales como alcaloides, kaempferol, ramnetina, isoquercitrina, campesterol, sitosterol y kaempferitina. (Sreelatha & Padma, 2009)

Además, la presencia de 1,1,3- trietoxybutano en todas las partes de la planta, la hace una fuente importante de **tratamientos de aguas residuales** como modificadores hidrófobos. (Sandoval Arreola M., 2013)

Todo esto nos demuestra que la *Moringa oleifera* es una planta de interés para las industrias. Esta planta puede ser de gran utilidad gracias a su elevado contenido en compuestos bioactivos. Para la extracción de estos compuestos se utilizan tecnologías limpias, como son la extracción con ultrasonidos, baño o PLE.

## 1.2 Métodos de extracción

La **extracción convencional** está basada en un baño térmico, donde se incubarán las muestras durante un periodo de tiempo con agitación magnética.

La **extracción asistida con ultrasonidos** consiste en unas ondas mecánicas que producen efectos de rarefacción y compresión en muestras líquidas. Esto lleva a la formación de burbujas de cavitación, que se distribuyen por todo el líquido y aumentan de tamaño hasta que finalmente colapsan. La implosión de estas burbujas produce una acumulación de energía y una formación de microcorrientes. Los fenómenos de cavitación, que se muestran en la figura 2, conducen a altos esfuerzos cortantes. Esto dará efectos como desprendimiento de superficie y degradación de partículas.

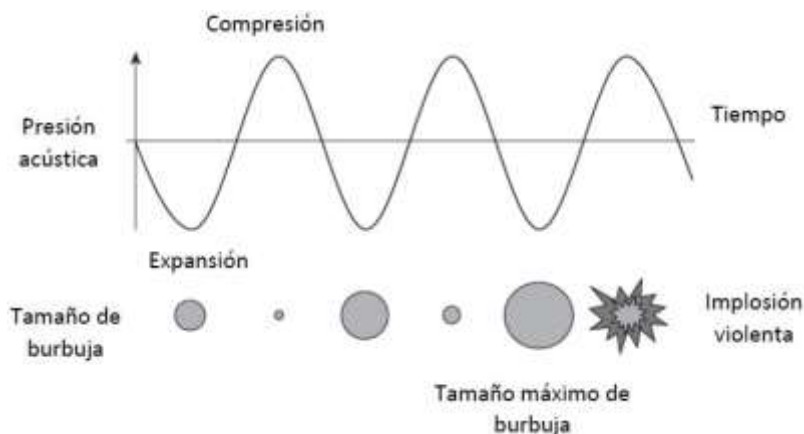


Figura 2. Fenómeno de cavitación durante el ultrasonido. (Boletín Científico :: UAEH, n.d.) Recuperado de: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icap/n3/a5.html>

La extracción de ultrasonido no actúa con un único mecanismo sino a través de diferentes mecanismos independientes o combinados como son la fragmentación, la erosión, la capilaridad, detexturación y sonoporación.

Una consecuencia directa de la reducción de la partícula es el aumento del área de superficie del sólido, resultando en una mayor transferencia de masa y una mayor tasa de extracción y rendimiento. (Chemat et al., 2017)

El proceso de **extracción con agua presurizada** se basa en el empleo de agua líquida a alta temperatura, para ello se trabaja a una presión por encima de la que corresponde a la saturación a la temperatura de trabajo. En la Figura 3 se muestra el diagrama de fases para el agua en la que se puede observar la curva de saturación.

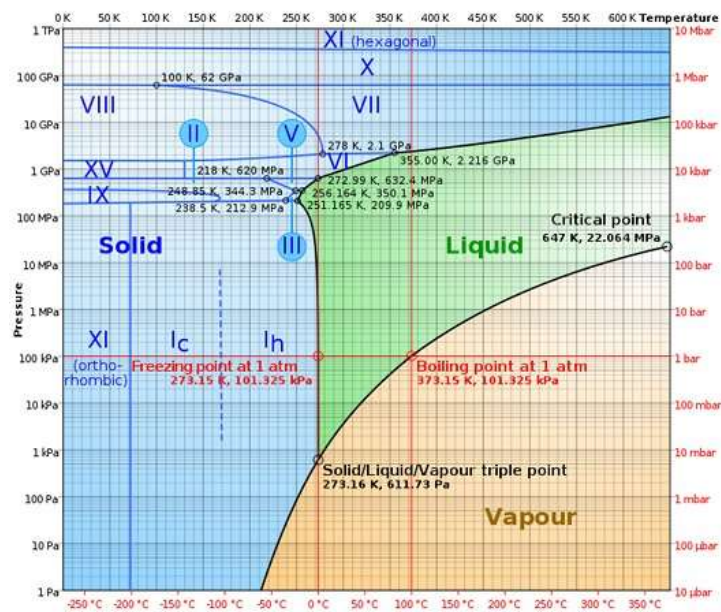


Figura 3. Diagrama fases de agua. (Propiedades del agua, n.d.) Recuperado de: [http://laplace.us.es/wiki/index.php/Propiedades\\_del\\_agua](http://laplace.us.es/wiki/index.php/Propiedades_del_agua)

El aumento de temperatura disminuye las interacciones electrostáticas entre las moléculas de agua y también entre las moléculas de agua y sus alrededores, iones y moléculas. Es decir, el agua líquida a temperatura elevada (y presión) hace que el agua sea menos polar.

La presión es principalmente aplicada para mantener el agua en estado líquido, aunque algunas referencias indican que una presión elevada ayuda a humedecer la matriz de la muestra, mejorando la eficiencia de extracción.

Además de la polaridad y la densidad hay otras propiedades que también varían con la temperatura. La constante de disociación del agua aumenta a mayor temperatura, esto implica que el pH cambia, y la fuerza iónica del hidronio y el hidróxido es significativamente mayor.

Esto afecta de manera que el riesgo de reacciones no deseadas, como la hidrólisis, aumenta, ya que la fuerza iónica es mayor y el pH es inferior.

Además, hay algunas propiedades relacionadas con la transferencia masiva como la viscosidad, la difusividad y la tensión superficial, que también se ven afectadas por la temperatura. (Plaza & Turner, 2015).



El descenso en la constante dieléctrica y un aumento de la difusividad hacen que aumente la solubilidad de los analitos, lo que permite una rápida y eficiente extracción con el mínimo disolvente. En la Figura 4 vemos como varían algunas de las propiedades físicas del agua con la temperatura (densidad, producto iónico y constante dieléctrica).

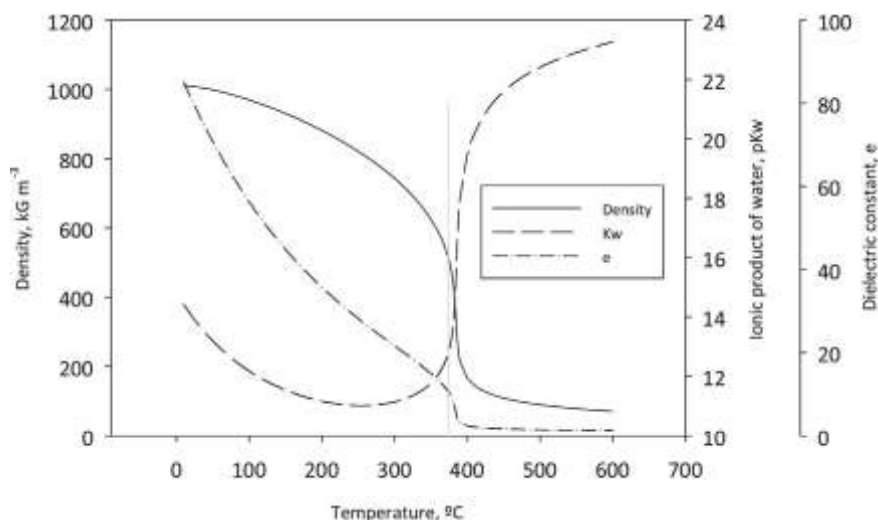


Figura 4. Propiedades del agua en función de la temperatura (densidad, producto iónico y constante dieléctrica). Recuperado de: (Cocero et al., 2018)

## 2. OBJECTIVES

The overall objective of this work is the extraction of total phenolic compounds from the Moringa leaf. The effect of the type of extraction and extraction conditions will be studied. For this purpose, the following partial objectives are established:

1. Compare the different extraction methods: conventional with agitation, ultrasonic assisted and pressurized water.
2. Study of different operating variables: amount of ethanol in the solvent, solute-solvent ratio and temperature.
3. Identification of individual phenolic compounds from Moringa leaves.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Materia prima

La materia prima empleada en este estudio es la hoja de Moringa, facilitada por Vitalmor y cultivada en Axarquía (Málaga).

### 3.2 Procedimiento de extracción de la hoja de Moringa

#### 3.2.1 Extracción de hoja de Moringa mediante técnica convencional

Las extracciones convencionales con disolventes se realizaron en un baño termostático (Figura 5) con agitación mecánica a 800 rpm y temperatura controlada. Las variables estudiadas fueron:

1. Tipos de disolvente: agua, etanol y mezcla hidroalcohólicas (20 -80 %)
2. Relación soluto-disolvente: 10, 12,5, 15 y 20 ml/g
3. Temperatura: 30, 50 y 70°C

Se fueron cogiendo alícuotas durante una hora, durante los siguientes tiempos: 0,5, 2, 5, 7, 10,15, 25, 30, 45 y 60 min.



Figura 5. Baño Termostático utilizado para la extracción convencional de hoja de Moringa.

### 3.2.2 Extracción asistida por ultrasonido (UAE) de hoja de Moringa.

Esta extracción se realizó utilizando un equipo de Ultrasonidos Bioblock Vibracell 75043 (figura 6). El proceso de extracción se llevó a cabo de manera discontinua, cada 5 segundos el equipo paraba otros 5, y a una amplitud del 100%. El proceso se realizó en torno a unos 50°C, dicha temperatura fue controlada usando un sistema de recirculación de agua. El tiempo establecido de ultrasonido fueron 20 min, por lo que el proceso tarda 40 min en total.

Al igual que en el caso del baño se pesa una cierta cantidad de hojas y se mezcla con los diferentes disolventes, y en diferentes concentraciones. En cada extracción se toman alícuotas cada 0, 0,5, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 min.

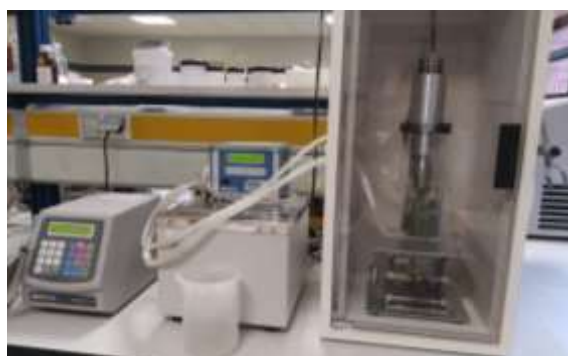


Figura 6. Equipo de Ultrasonido utilizado en la EAU de hoja de Moringa.

### 3.2.3 Extracción de hoja de Moringa mediante PLE (Extracción líquida presurizada)

La extracción con agua presurizada se realizó en un equipo construido en el área de Ingeniería química de la Universidad de Burgos (Figura 7). Es un equipo semicontinuo, con un reactor cuyo volumen es de 27 ml, a través del cual se hace bombear agua de forma continua a un caudal de máximo 10 ml/min mediante una bomba de HPLC (Gilson 305) que nos proporciona una presión de 50bar suficiente para que el agua se encuentre en estado líquido a la temperatura de trabajo.

Se carga la muestra en la celda de extracción, junto con unas bolas de vidrio (diámetro 2 mm) encargadas de que la muestra no se apelmace y el sistema no se bloquee. En este caso no se

pudo añadir más que 1,5 gramos de muestra, ya que era necesario añadir gran cantidad de bolas entre la muestra.

Se cierra la celda con racores y filtros y se cubre la celda con mallas de cobre. Se introduce en el collarín y se cierra bien con ayuda de unas llaves. Y se conecta al sistema.

Antes de entrar en el reactor el agua se hace circular a través de una resistencia para que alcance la temperatura de extracción. En este estudio se seleccionó la temperatura de extracción de 160 °C. Una vez alcanzada la temperatura se hace circular el agua por el reactor cilíndrico y se toman muestras cada 20 minutos (Figura 8).

Transcurrido el tiempo de extracción, 2 horas y media en este caso, se apagan las resistencias eléctricas y la bomba del disolvente, el ordenador y la balanza. Se deja que el sistema se enfríe y pierda presión por sí solo. Una vez que el sistema se encuentra a presión y temperatura ambiente se limpia con agua y NaOH.



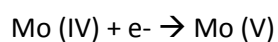
Figuras 7 y 8. Equipo PLE y extracciones.

### 3.3 Métodos de caracterización de la hoja de Moringa

#### 3.3.1 Polifenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para medir el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en la hoja de Moringa. Previo análisis las muestras se centrifugan y se diluyen si es necesario (1:10 en extracción convencional y US).

El método de Folin-Ciocalteu se basa en una reacción óxido-reducción entre el reactivo Folin-Ciocalteu y los polifenoles de la muestra. El reactivo Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. Este reactivo de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad medimos espectrofotométricamente a 750nm para evaluar el contenido en polifenoles.



Para cada muestra se hacen dos replicas, se mezclan en el siguiente orden 100 µl muestra, 2,8 ml agua destilada, 100 µl Folin-Ciocalteu y 2ml de Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 7,5%(p/v). Se realiza un blanco de muestra, sin el reactivo Folin-Ciocalteu, y además un autocero con todos los reactivos, pero sin la muestra. En el momento en el que se añade el carbonato sódico comienza la reacción. Transcurridos 60 min de reacción en oscuridad a temperatura ambiente se mide el color de la muestra a 750nm.

Para cuantificar los compuestos fenólicos obtenidos en nuestras muestras realizamos una curva patrón de ácido gálico siguiendo el mismo método colorimétrico. En este trabajo se realizaron dos curvas de calibrado diferentes (Tabla 1), una con agua y otra con etanol para determinar si el disolvente ejercía un efecto en la determinación final de PT. Se ha utilizado el programa Statgraphics para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las dos curvas y se ha obtenido que no hay diferencias significativas entre las pendientes, ni entre los términos independientes de estas curvas con un 90 % de confianza, siendo el valor p mayor o igual a 0,1.

Tabla 1. Curvas de calibrado de polifenoles totales con agua y etanol como disolventes en el rango de concentración de 0 a 2000mg/l.

Disolvente	Pendiente*	OO*	R2
Agua	0.00181241	-0.0325778	0.998151
Etanol	0.0016616	0.934028	0.994378
P > 0.1	0.2036	0.2689	

Como no existe diferencia significativa entre ambas utilizaremos en todos los casos la curva de patrón del agua, que tiene mayor coeficiente de determinación.

Por último, realizamos una tercera curva de calibrado (Tabla 2), ya que las muestras extraídas mediante PLE tienen una concentración muy pequeña, y no pueden cuantificarse con las curvas realizadas anteriormente.

Tabla 2. Curva de calibrado de polifenoles totales con agua como disolvente en el rango de concentración de 0 a 50 mg/l.

Disolvente	Pendiente*	OO*	R2
Agua	0.0028	-0.0006	0.9940

### 3.3.2 HPLC (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento)

El HPLC es una técnica que permite separar, aislar e identificar los analitos de una mezcla. En este caso lo vamos a utilizar para la identificación de los polifenoles de nuestra muestra.

La cromatografía líquida consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La muestra en solución se inyecta en la fase móvil. Los componentes de la solución migran de acuerdo con las interacciones no covalentes de los compuestos de la columna. Son estas interacciones las que determinan la separación de los contenidos en la muestra.

El equipo utilizado para el análisis de polifenoles individuales ha sido HPLC-DAD Agilent 1100 con una columna Kinetex 5 µm Biphenyl 100 Å, con una superficie de 250 x 4,6 mm. La fase móvil (fase A) es acetato amónico 5 mM en agua con 1% de ácido acético y la fase estacionaria (fase B) acetato amónico 5 mM en acetonitrilo con 1% de ácido acético. El caudal se ajustó a 0,8 ml/min y la temperatura a 25 °C. La detección UV se realizó a 240, 280, 330, 340, 350 y 370 nm. Antes de la inyección, los extractos se filtraron a través de un tamaño de poro de 0,45 µm.

La identificación de compuesto de polifenoles individuales se realizó comparando los tiempos de retención y los datos espectrales con los de los estándares auténticos.

## 4.RESULTADOS

### 4.1 Comparación entre extracción convencional y asistida con ultrasonidos

En primer lugar, se ha comparado la eficacia en la extracción de compuestos fenólicos totales mediante extracción convencional con agitación mecánica y extracción asistida con ultrasonidos (UAE). Se han realizado empleando agua como disolvente y a dos concentraciones de etanol en el disolvente (20 y 50 %). El resto de las condiciones fueron 50 °C y una relación soluto: disolvente 1g: 10mL. Los resultados se muestran en la Figuras 9, 10 y 11.

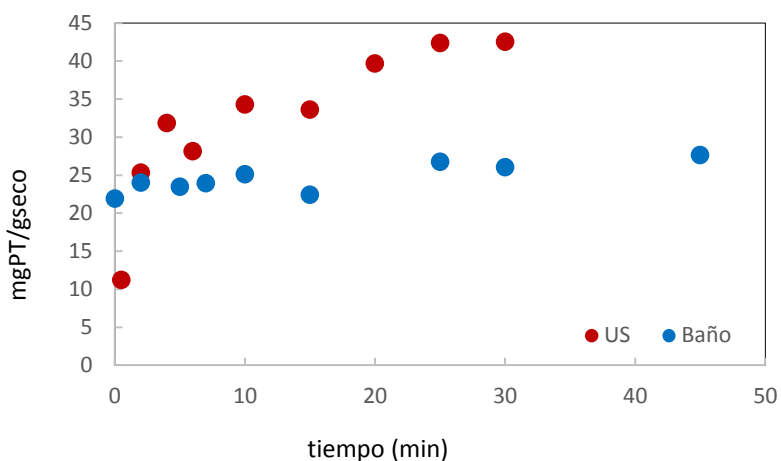


Figura 9. Curva de extracción de PT en agua a 50°C y 1g moringa: 10mL disolvente (● US ● baño)

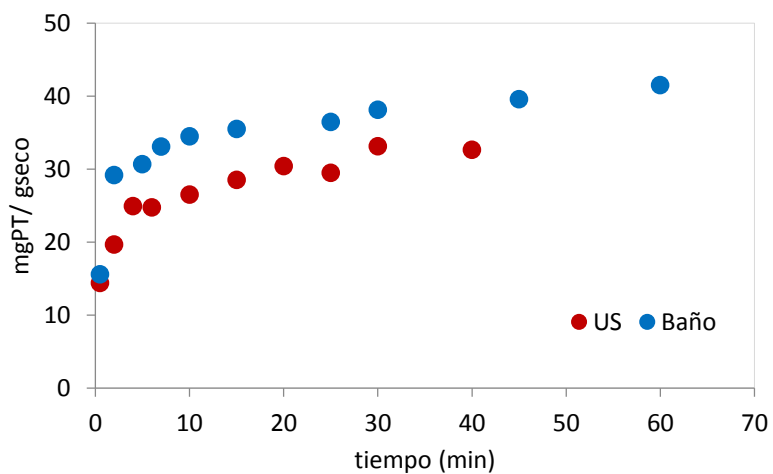


Figura 10. Curva de extracción de PT en una disolución al 20% de etanol a 50°C y 1g moringa: 10mL disolvente (● US ● baño)

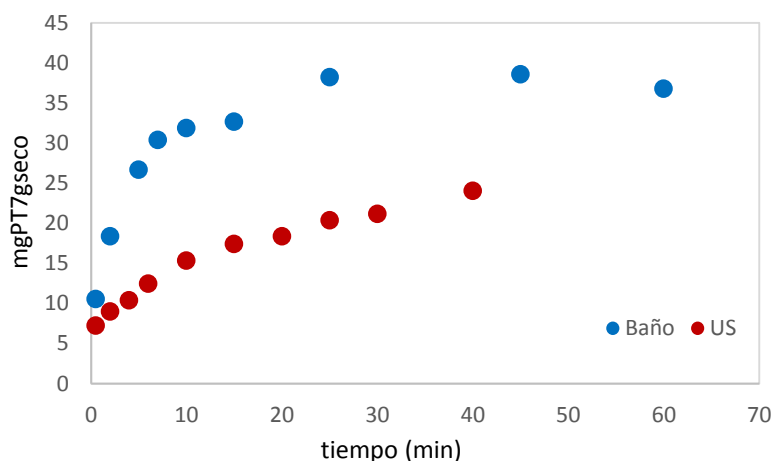


Figura 11. Curva de extracción de PT en disolución al 50% de etanol a 50°C y 1gmoringa: 10mL disolvente (● US ● baño)

La eficacia de extracción de polifenoles con agua como disolvente es mayor en ultrasonidos que en extracción convencional. Sin embargo, cuando el disolvente utilizado es etanol acuoso es mejor utilizar el método convencional.

Según las Figuras anteriores se puede observar como la extracción asistida con US solo mejoró la cinética de extracción cuando las condiciones de extracción convencional no son las óptimas como al emplear agua como disolvente. En bibliografía, (Rodríguez-Pérez et al., 2015) realizaron extracciones de compuestos fenólicos de hojas de moringa empleando diferentes disoluciones acuosas de metanol, etanol y acetona durante 1 h. Empleando un 50 y 70 % de etanol, obtuvieron  $27 \pm 2$  y  $24,3 \pm 0,3$  mg/gseco respectivamente, mediante maceración. Comparando con UAE, estos autores llevaron la extracción en el mismo tiempo final, pero con cuatro extracciones consecutivas empleando disolvente fresco en cada una de ellas. En la primera extracción obtuvieron en todos los casos con UAE menor cantidad de compuesto fenólicos,  $24 \pm 3$  Y  $12,6 \pm 0,2$  mg/gseco para el 50 y 70% de etanol respectivamente (comparado con el  $27 \pm 2$  y  $24,3 \pm 0,3$  mg/gseco en maceración).

Confrontamos nuestros datos experimentales con los datos obtenidos en la bibliografía en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de nuestros datos experimentales con los obtenidos en la Bibliografía (Rodríguez-Pérez et al., 2015) mediante la extracción convencional y UAE con un disolvente al 50% de etanol y una temperatura de 50 ° C.

50% Etanol	Datos experimentales	Bibliografía (Rodríguez-Pérez et al., 2015)
Ultrasonidos	$24 \pm 0,49$	$24 \pm 3$
Convencional	$36,76 \pm 0,07$	$27 \pm 2$

Nuestros resultados son muy similares a los encontrados en el artículo de C. Rodríguez Pérez. En el caso de la extracción convencional el valor de polifenoles totales obtenidos después de 1 hora es algo mayor, seguramente debido a que la temperatura que utilizamos fue superior.

## 4.2 Efecto del disolvente

Se ha realizado un barrido para diferentes mezclas hidroalcohólicas mediante la extracción convencional con agitación. Las experiencias que se han realizado incluyen extracciones con agua y disoluciones al 20, 50, 80 y 100% de etanol. La temperatura de trabajo fue 50 °C y la relación soluto: disolvente 1g: 10mL. Los resultados se muestran en la Figuras 12, 13 y 14.

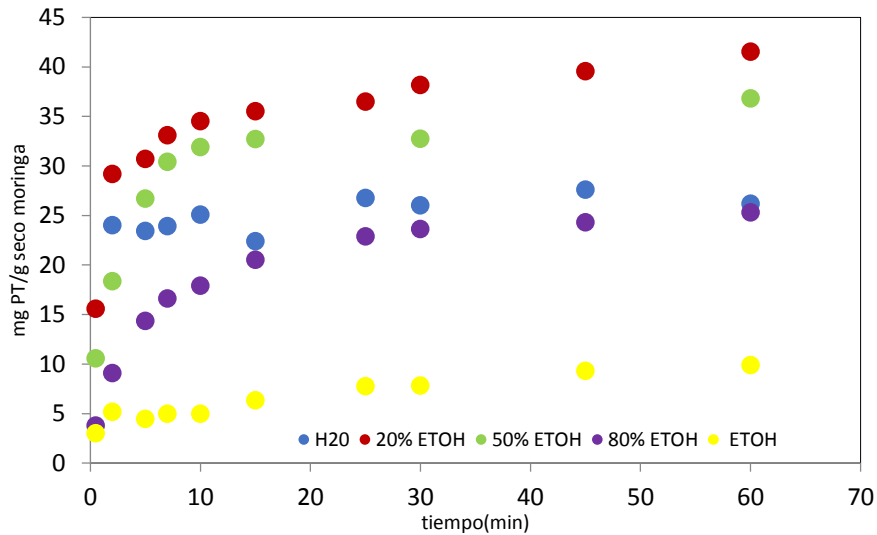


Figura 12. Curva de PT con extracción convencional a 50°C y concentración de 1g moringa: 10mL en diferentes disolventes (agua, 20%, 50%, 80% y 100% de etanol).

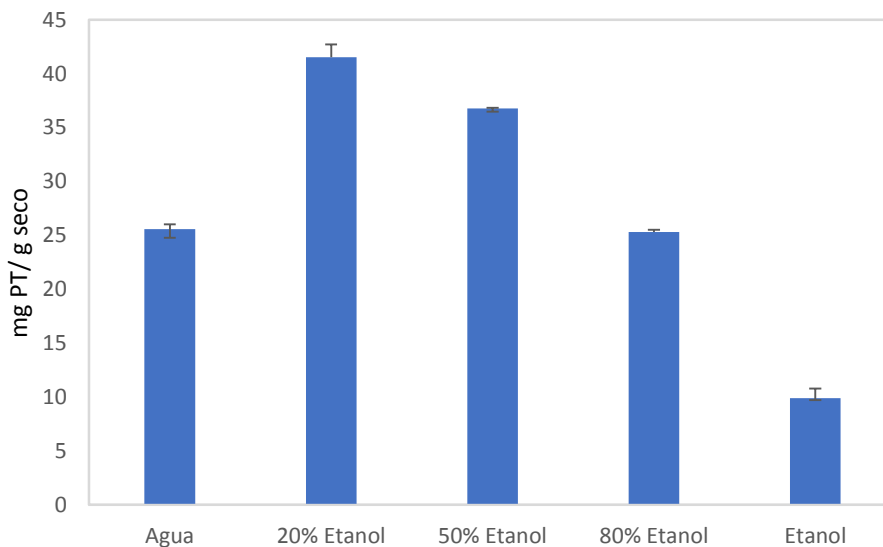


Figura 13. Diagrama de PT tras una hora de extracción convencional a 50°C y concentración de 1g moringa: 10mL en diferentes disolventes (agua, 20%, 50%, 80% y 100% de etanol).

En las Figuras 12 y 13 se obtiene como resultado que la mezcla hidroalcohólica con un 20% de etanol consigue la mayor eficiencia para la extracción convencional.

El agua pura como disolvente proporcionó una mejor cinética de extracción que el etanol puro o la mezcla alcohólica de etanol con alto porcentaje de etanol (80%). Por lo tanto, el agua

podría crear un medio más polar que facilite la extracción de compuestos fenólicos. El agua y las mezclas con baja concentración de etanol podrían acceder a las células, pero una alta concentración de etanol podría causar desnaturalización de proteínas, evitando la disolución de polifenoles y luego influyendo en la extracción. (Carciochi et al., 2018)

Para la extracción asistida con ultrasonidos se realiza otro barrido, esta vez utilizamos como disolventes agua, una disolución al 20 % de etanol y otra al 50%, en las mismas condiciones que la extracción convencional, concentración 1g: 10ml y 50°C.

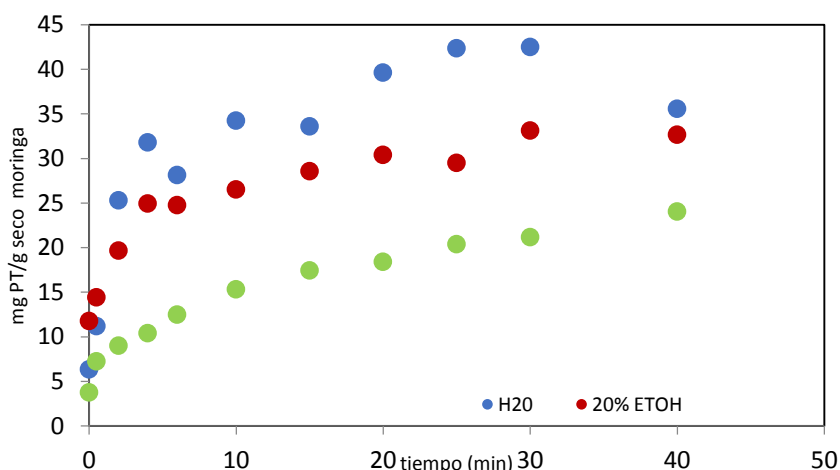


Figura 14. Curva de PT con extracción asistida por ultrasonidos a 50°C y concentración de 1g moringa: 10mL en diferentes disolventes (agua ●, 20% ●, 50% ●)

En el caso de la extracción asistida con ultrasonidos el agua pura es el disolvente que revela mayor eficacia, seguido por la disolución al 20% de etanol y por último la de 50%. Esto se puede deber a la viscosidad de la mezcla. La viscosidad disminuye con la presencia de agua, que podría haber mejorado la transferencia de masa. (Ghasemzadeh et al., 2015).

En la Figura 15 se representa el rendimiento en polifenoles totales en función de la constante dieléctrica del medio de extracción. Para ello se ha utilizado la siguiente expresión

$$\ln \varepsilon_{M,T} = f_W \ln \varepsilon_{W,T} + f_E \ln \varepsilon_{E,T} + 246.8 \frac{f_W f_E}{T} + 22.1 \frac{f_W f_E (f_W - f_E)}{T} - 51.5 \frac{f_W f_E (f_W - f_E)^2}{T} \quad [1]$$

Donde T es la temperatura en K,  $\varepsilon_{M,T}$ ,  $\varepsilon_{W,T}$  y  $\varepsilon_{E,T}$  son las constantes dieléctricas de la mezcla, agua y etanol respectivamente a temperatura T, y  $f_W$  y  $f_E$  son las fracciones volumétricas de agua y etanol. Además las ecuaciones [2] y [3] se usaron para calcular  $\varepsilon_{W,T}$  y  $\varepsilon_{E,T}$  respectivamente:

$$\ln \varepsilon_{W,T} = 5.769 - 0.00471 \times T \quad [2]$$

$$\ln \varepsilon_{E,T} = 5.034 - 0.00619 \times T \quad [3]$$



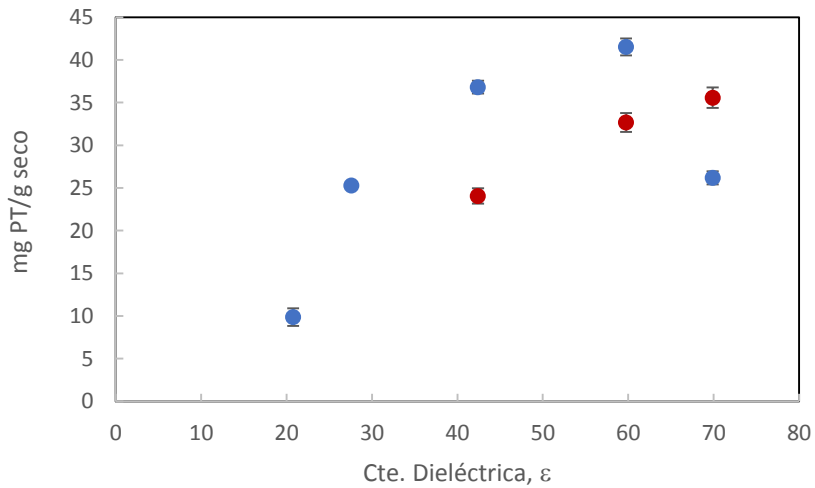


Figura 15. Extracción de PT en función de la constante dieléctrica del disolvente para extracción convencionales ● y UAE ●

Se observan en la Figura 15 que en el caso de extracciones convencionales el máximo en la extracción se obtiene para mezclas hidroalcohólicas con bajo contenido en etanol, en torno al 20 %, que corresponde con una constante dieléctrica inferior a la del agua pura, pero superior a la del etanol ( $\epsilon_{\text{Mezcla}} = 59.76$ ) Mientras que para la UAE los mejores rendimientos se obtuvieron empleando agua como disolvente que posee una gran constante dieléctrica ( $\epsilon_{\text{Water}} = 69.89$ ).

### 4.3 Efecto de la relación soluto-disolvente

Se determina si existe variación en la eficacia de la extracción de polifenoles totales por efecto de la concentración soluto-disolvente. Para ello preparamos cuatro curvas con diferentes concentraciones mediante la extracción convencional y US. Las concentraciones con las que vamos a trabajar son 1:10, 1:12,5, 1:15 y 1:20 g de hoja de Moringa por disolvente. El disolvente que se utilizó fue una mezcla de etanol acuoso al 20% y la temperatura fue de 50°C.

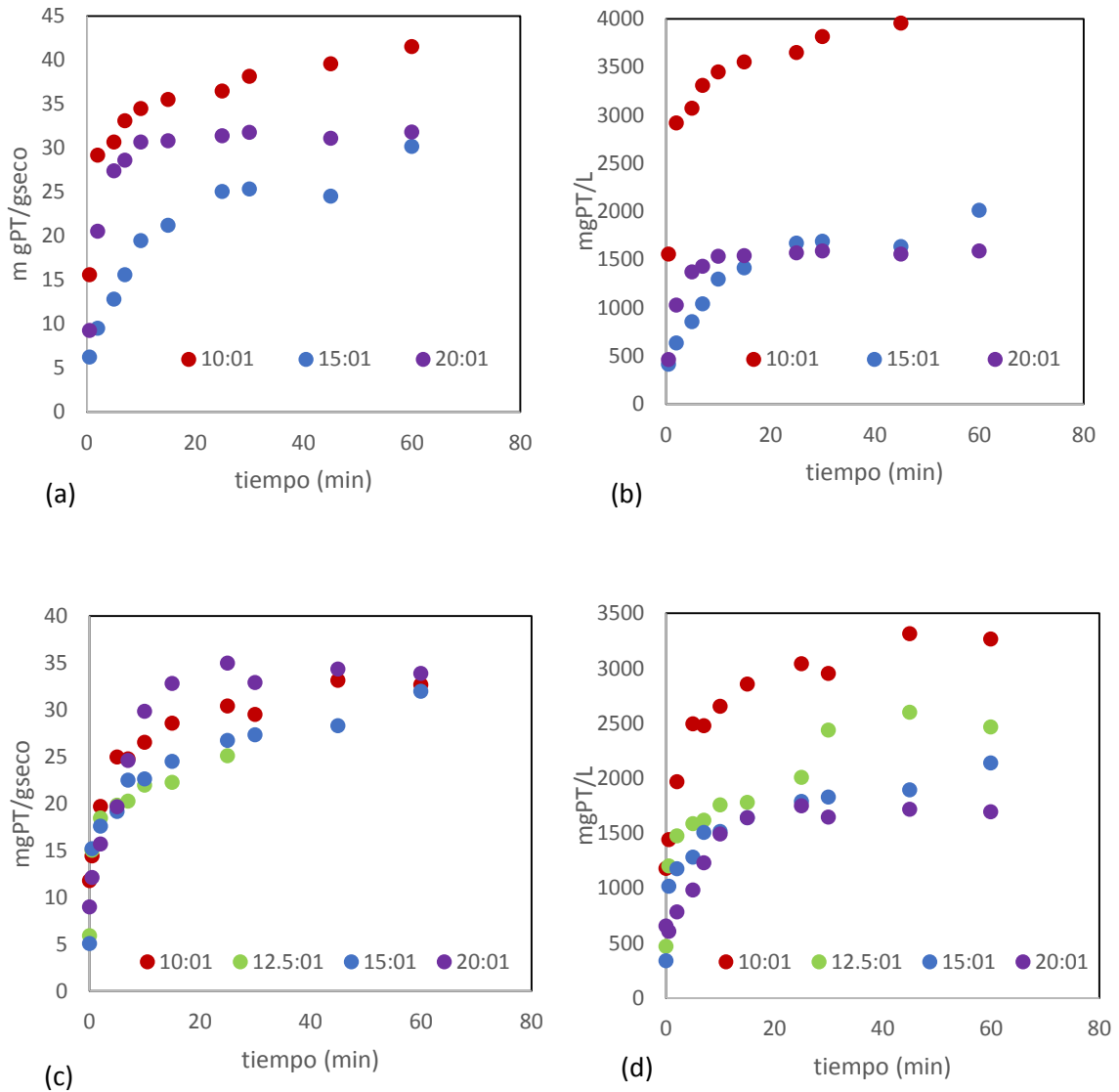


Figura 16. Curvas de extracción de PT a 50°C empleando como disolvente 20 % etanol a diferentes relaciones disolvente: soluto (10:01 ●, 12,5:01 ●, 15:01 ● y 20:01 ●) (a) (b) Extracción convencional (c) y (d) UAE . Las curvas (a) y (c) expresan rendimiento de extracción (mg PT/gseco) y las curva (b) y (d) expresan concentración de PT en el medio de extracción.

La concentración disolvente: soluto de mayor eficacia en las extracciones, tanto en la convencional como en la asistida con ultrasonidos, es la de 10ml de disolvente por 1g de hoja de Moringa.

Se representa el rendimiento y la concentración de extracción en función de las diferentes concentraciones disolvente- soluto al fin de la extracción. (Figuras 17 y 18).

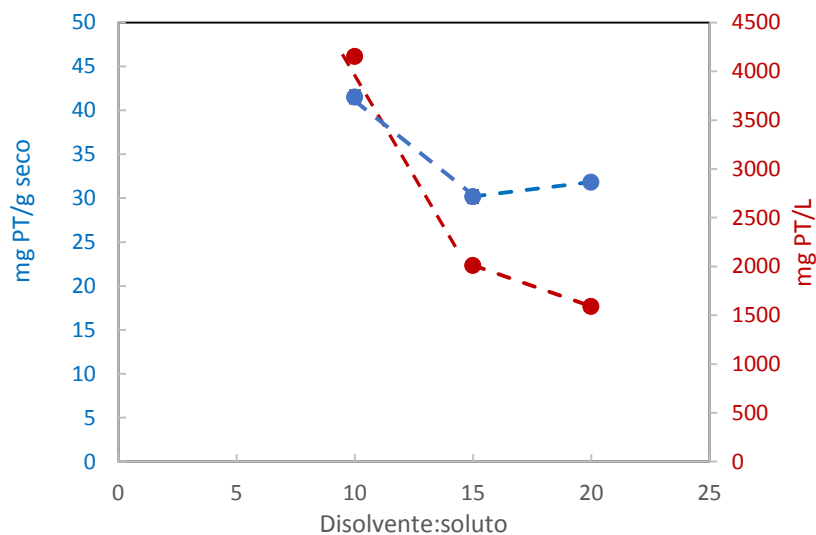


Figura 17. Rendimiento ● y concentración ● de la extracción vs disolvente: soluto (10,15 y 20) ml:g tras una hora de extracción convencional a 50°C con disolvente al 20% de etanol.

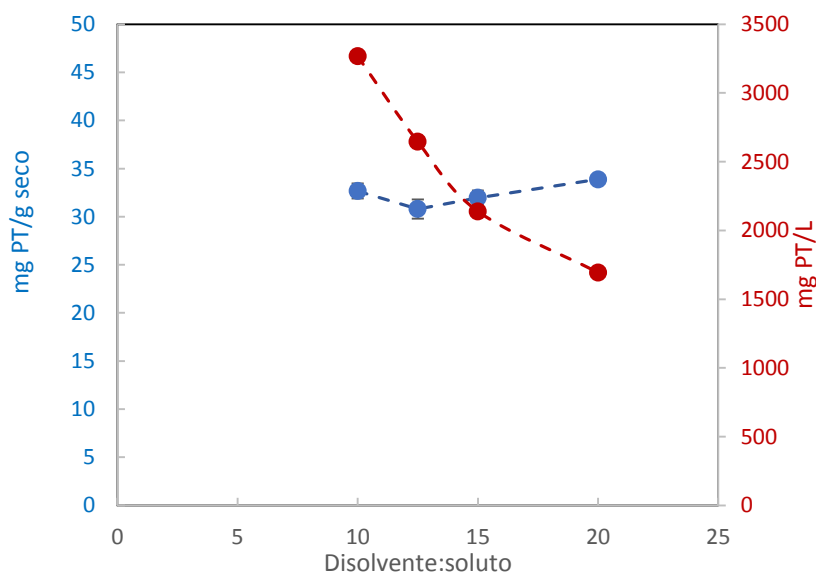


Figura 18. Rendimiento ● y concentración ● de la extracción vs disolvente: soluto (10, 12,5, 15 y 20) ml:g tras una hora de UAE a 50°C con disolvente al 20% de etanol.

Las figuras 17 y 18 muestran que la concentración de polifenoles en el extracto (mg PT/L) aumentó a medida que la proporción de disolvente: soluto disminuyó en el rango de 20 a 10 ml:g hoja de moringa seca. El efecto que tiene la concentración disolvente-soluto en el rendimiento (mg PT/g) es menos notable, en el caso de la extracción convencional sí que se puede apreciar una pequeña disminución al aumentar la concentración disolvente- soluto, sin embargo en la caso de la UAE no apreciamos ningún efecto.

#### 4.4 Efecto de la temperatura en la extracción convencional

Para comprobar el efecto que tiene la temperatura llevamos a cabo tres cinéticas de polifenoles totales a diferentes temperaturas mediante la extracción convencional con agitación magnética, con agua y una solución al 20% de etanol como disolventes y a una

concentración soluto- disolvente de 1 g de hoja de Moringa por 10 ml de disolvente. Las temperaturas utilizadas serán 30, 50 y 70°C.

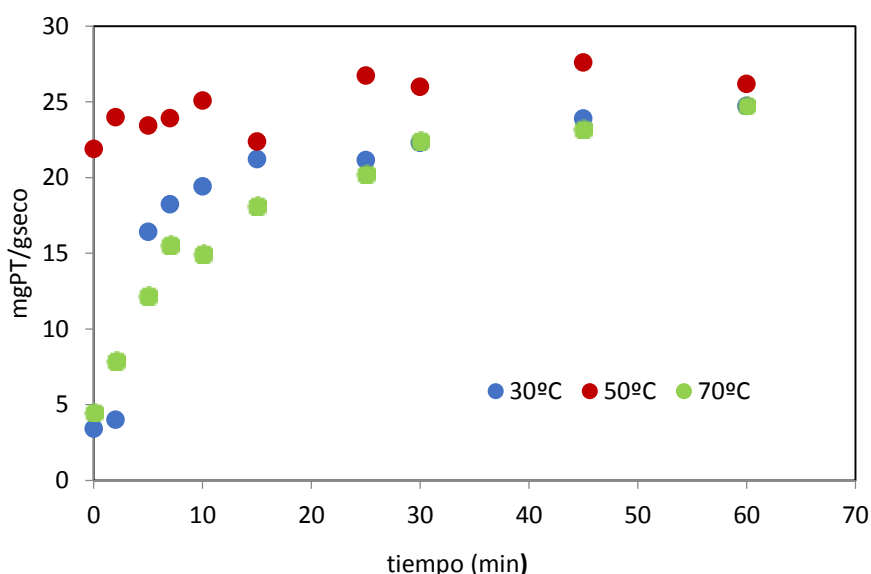


Figura 19. Curvas de PT con extracción convencional a diferentes temperaturas (30°C ●, 50°C ● y 70°C ●), utilizando agua como disolvente y una concentración de 1:10 g moringa/ml de disolvente.

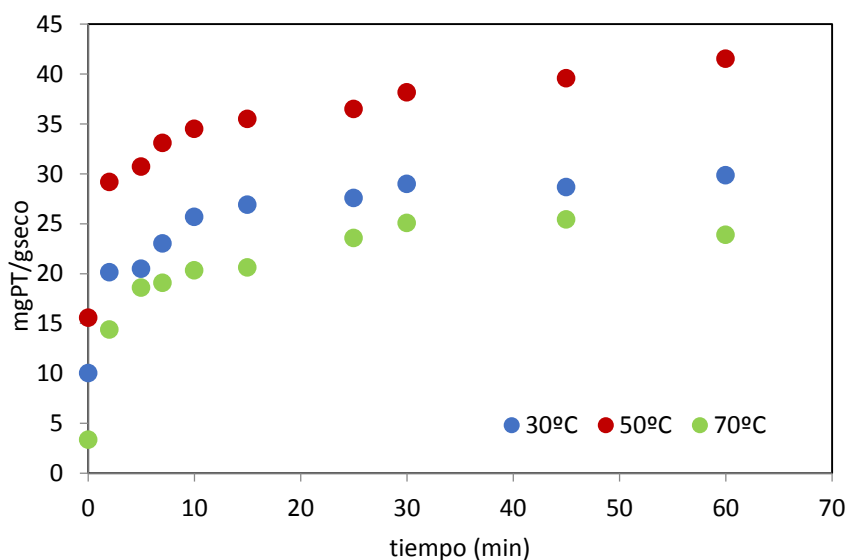


Figura 20. Curvas de PT con extracción convencional a diferentes temperaturas (30°C ●, 50°C ● y 70°C ●), utilizando una disolución de etanol acuosa al 20% de etanol como disolvente y una concentración de 1:10 g moringa/ml de disolvente.

En las Figuras 19 y 20 podemos ver que existe variación de la eficiencia de la extracción convencional en función de la temperatura. La temperatura óptima de trabajo es 50 °C.

El aumento de la temperatura por encima de 50 °C puede llevar a la disminución del contenido de polifenoles en la muestra, probablemente debido a su degradación, esto puede ser la causa de que se obtuvieran extractos con menor contenido fenólico a una temperatura de 70 °C. (Rajbhar et al., 2015).

#### 4.5 Extracción de compuestos fenólicos totales de la hoja de Moringa mediante agua presurizada (PLE).

La extracción con PLE comienza cuando la temperatura de entrada del extractor es estable en torno a 160°C. En la figura 21 podemos ver el perfil de temperaturas a la entrada del extractor a lo largo del tiempo, obteniendo una temperatura media de  $160.5 \pm 6$ .

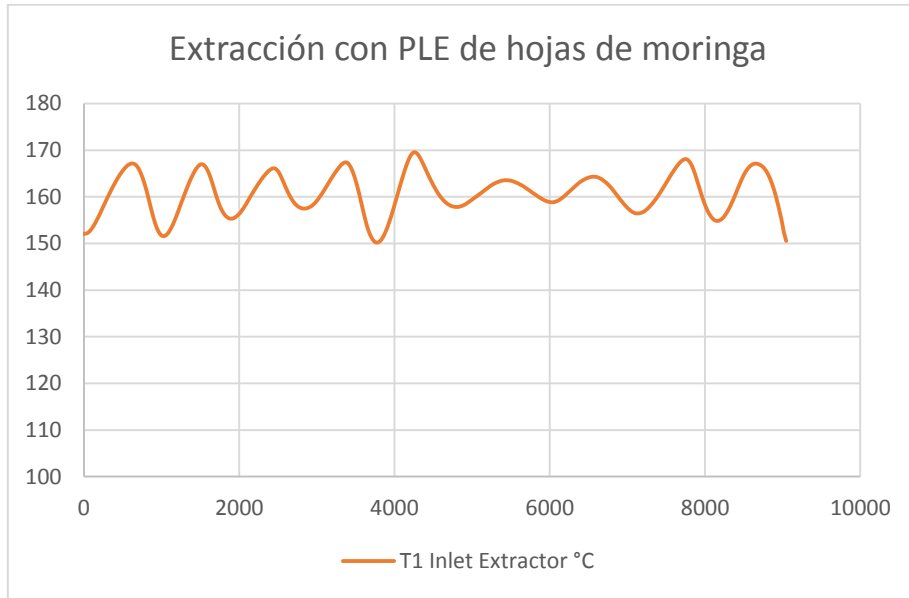


Figura 21. Control de las temperaturas de PLE a la entrada del extractor.

Representamos en la figura 22 los valores obtenidos de polifenoles totales mediante la extracción de agua presurizada tras las 2 horas y media de extracción.

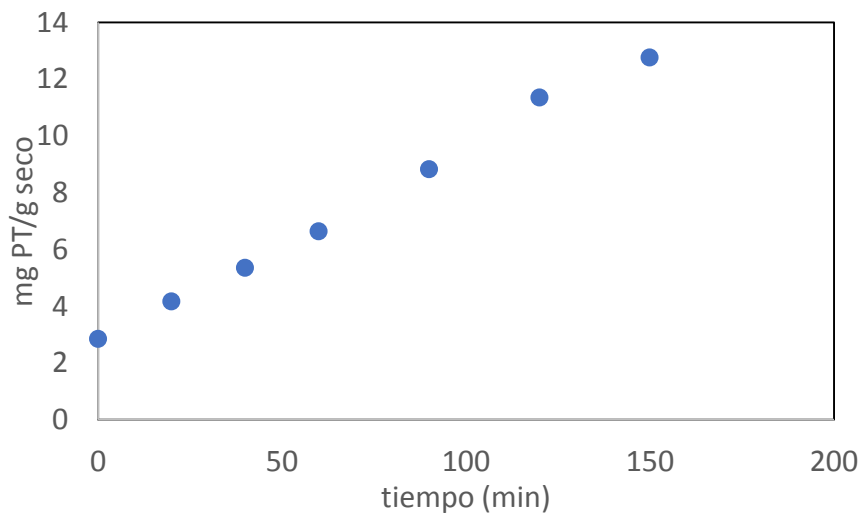


Figura 22. Polifenoles totales en la extracción de PLE. A condiciones de 160°C y 50 bar.

La extracción con agua presurizada no obtiene los resultados esperados con nuestra muestra. El valor final de extracción es 7,337 mg equivalentes de ácido gálico/g seco de hoja de Moringa. Comparando con las extracciones anteriormente utilizadas, convencional y asistida por ultrasonidos, es la que peor resultado nos ofrece.

A partir de la ecuación 2 se ha calculado la constante dieléctrica del agua 160°C, obteniendo un valor de 41.6, similar al que corresponde para mezclas hidroalcohólicas del 50 % (ver Figura 14), sin embargo, como he explicado anteriormente, la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos es la tercera parte de la extracción obtenida con agua como disolvente a 50°C.

Los valores tan bajos en la extracción con PLE pueden deberse a la degradación de los polifenoles por las altas temperaturas debido al elevado tiempo de residencia de los compuestos extraídos:

$$\text{Tiempo de residencia, } \tau = \frac{V \text{ reactor, mL}}{\text{Flujo alimentación } \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}}\right)}$$

El volumen del reactor es 27mL y el caudal de trabajo fue 6 ml/min que corresponde con un tiempo de residencia de 4.5 min.

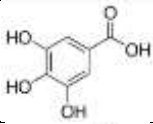
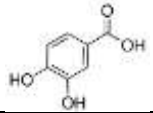
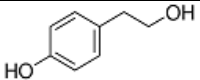
#### 4.6 Identificación de compuestos fenólicos.

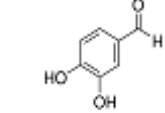
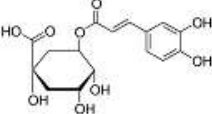
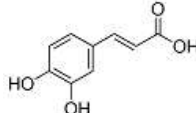
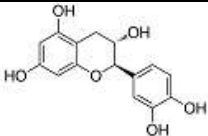
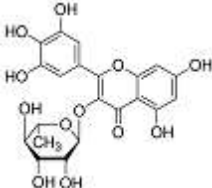
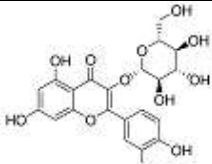
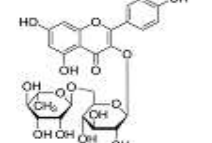
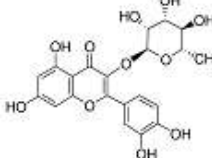
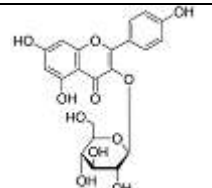
Para la identificación de compuestos fenólicos analizamos mediante HPLC diferentes extractos de extracción convencional y extracción asistida por ultrasonidos, en diferentes disolventes.

El programa del HPLC nos da el área de cada pico del cromatograma, para obtener la cantidad por gramo seco de hoja de Moringa utilizamos curvas de calibrado de cada compuesto aislado. En el caso de Myricetin-3-rhamnosido y Kaempferol rutinoso no teníamos la curva de calibrado, por lo que hemos utilizado la curva de la familia a la que pertenece cada uno, Myrecitina y Kaempferol. Cada compuesto ha sido identificado en su señal de máxima absorbancia (280-330nm).

Como se observa en la Tabla 4 los mejores resultados de identificación se encuentran en los extractos en los cuales se ha utilizado como disolvente una mezcla hidroalcohólica y una extracción convencional. El extracto en el que se han identificado más cantidad de compuestos fenólicos ha sido el extraído mediante el método convencional con una mezcla al 50% como disolvente (12, 38 mg/g seco).

Tabla 4. Identificación de compuestos fenólicos mediante la técnica HPLC, con extracción convencional en disolventes al 20%, 50% y 80% etanol y agua y con extracción asistida con ultrasonidos en disolvente al 20% de etanol y agua.

Compuesto fenólico	Estructura	20% etanol (CE) mg/g seco	50% etanol (CE) mg/g seco	80% etanol (CE) mg/g seco	Agua (CE) mg/g seco	20% etanol (UAE) mg/g seco	Agua (UAE) mg/g seco
Ácido gálico (1)		0,00	0,27	0,00	0,02	0,61	0,80
Ácido protocatéquico (2)		0,05	0,01	0,00	0,07	0,00	0,00
Tirosol (3)		1,50	1,67	0,21	1,59	1,17	1,77

Aldehído protocatéuico (4)		0,09	0,05	0,02	0,04	0,13	0,13
Ácido clorogénico (5)		0,41	0,45	0,24	0,04	0,38	0,32
Ácido cafeico (6)		0,95	0,93	0,93	0,64	0,92	0,37
Catequina (7)		0,21	0,14	0,10	0,18	0,00	0,00
Myricetin-3-rhamnosido (8)		0,21	0,23	0,22	0,18	0,24	0,18
Quercetina-3-glucosido (9)		4,50	5,61	5,46	2,35	4,28	2,43
Kaempferol rutinoso (10)		1,42	1,54	1,28	0,94	1,40	0,89
Quercetina-3-rhamnosido (11)		0,63	0,79	0,75	0,48	0,05	0,00
Kaempferol-3-glucosido (12)		0,54	0,69	0,70	0,00	0,58	0,32
<b>Total</b>		<b>10,49</b>	<b>12,38</b>	<b>9,91</b>	<b>6,54</b>	<b>9,77</b>	<b>7,20</b>

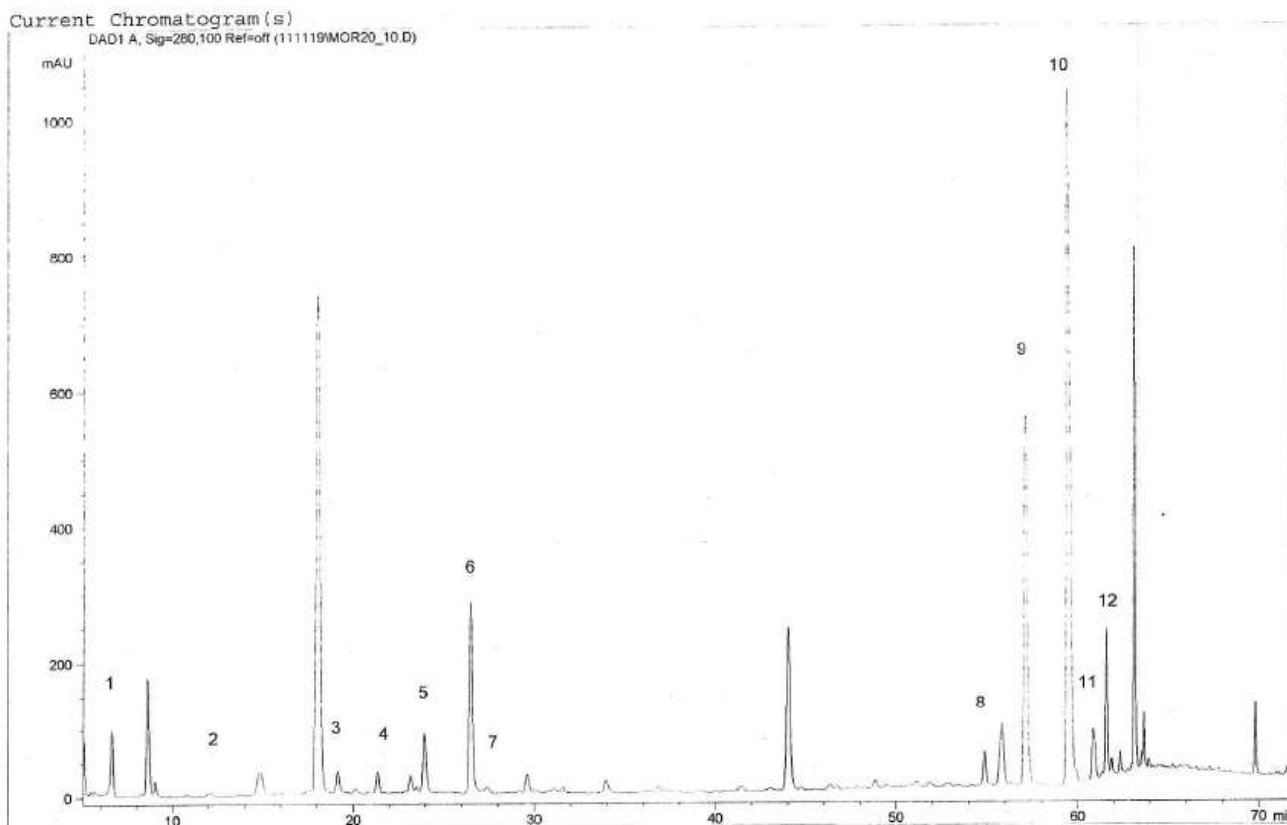


Figura 23. Identificación de compuestos fenólicos. Cromatograma extracción convencional con disolvente al 20% de etanol y señal a 280 nm. 1: Ácido gálico, 2: Ácido protocatéuico, 3: Tiroso, 4: Aldehído protocatéuico, 5: Ácido clorogénico, 6: Ácido cafeico, 7: Catequina, 8: Myricetin-3-rhamnosido, 9: Quercetina-3-glucosido, 10: Kaempferol rutinoso, 11: Quercetina-3-rhamnosido y 12: Kaempferol-3-glucosido

## 5. CONCLUSIONES

- Las mayores extracciones de polifenoles se obtienen con extracción convencional con agitación magnética con disolvente al 20% de etanol y con extracción asistida por ultrasonidos utilizando agua como disolvente, a 50 °C y relación soluto-disolvente de 1g de hoja de Moringa por 10 ml de disolvente
- La eficacia de extracción de polifenoles con agua como disolvente es mayor en ultrasonidos que en extracción convencional. Sin embargo si el disolvente utilizado es una mezcla hidroalcohólica se obtienen mejores resultados con el método convencional.
- Las mezclas hidroalcohólicas como disolvente tienen mejor eficacia con alto contenido en agua, que con alto contenido en etanol.
- La concentración disolvente: soluto de mayor eficacia en las extracciones, tanto en la convencional como en la asistida con ultrasonidos, es la de 10ml de disolvente por 1g de hoja de Moringa.



- La temperatura óptima de trabajo es 50 °C. El aumento de temperatura es directamente proporcional al incremento de eficacia hasta los 50 °C, a partir de esta temperatura el extracto sufre una degradación.
- La extracción convencional y la asistida por ultrasonidos dan mejores resultados que la de agua presurizada en la extracción de polifenoles totales en hoja de Moringa.
- Se identifican los siguientes compuestos fenólicos en la hoja de Moringa: ácido gálico, ácido protocatéquico, tirosol, aldehído protocatéquico, ácido clorogénico, ácido cafeico, catequina, myricetin-3-rhamnosido, quercetina-3-glucosido, kaempherol rutinoso, quercetina-3-rhamnosido y kaempherol-3-glucosido.
- Para la identificación de los compuestos mediante HPLC es ventajoso utilizar extractos con mezclas hidroalcohólicas como disolvente y de extracción convencional, frente a extractos con agua como disolvente o de extracción asistida por ultrasonidos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Boletín Científico :: UAEH. (n.d.). Retrieved January 10, 2020, from <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icap/n3/a5.html>
- Carciochi, R. A., Sologubik, C. A., Fernández, M. B., Manrique, G. D., & D'Alessandro, L. G. (2018). Extraction of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grain: Optimization and kinetics modeling. *Antioxidants*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/antiox7040045>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Cocero, M. J., Cabeza, Á., Abad, N., Adamovic, T., Vaquerizo, L., Martínez, C. M., & Pazo-Cepeda, M. V. (2018). Understanding biomass fractionation in subcritical & supercritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 133(May 2017), 550–565. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.012>
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Juraimi, A. S., & Tayebi-Meigooni, A. (2015). Comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of hashemi rice bran. *Molecules*, 20(6), 10822–10838. <https://doi.org/10.3390/molecules200610822>
- Guaycha Pérez, N., Jaramillo Jaramillo, C., Cuenca Buele, S., Tocto León, J., & Márquez Hernández, I. (2017). Estudios farmacognósticos y toxicológicos preliminares de hojas, tallo y raíz de moringa (*moringa oleifera* Lam.) // Preliminary pharmacognostic and toxicological studies of leaves, stem and Moringa root (*Moringa oleifera* Lam.). *Revista Ciencia UNEMI*, 10(22), 60–68. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol10iss22.2017pp60-68p>

- Karthivashan, G., Tangestani Fard, M., Arulselvan, P., Abas, F., & Fakurazi, S. (2013). Identification of bioactive candidate compounds responsible for oxidative challenge from hydro-ethanolic extract of moringa oleifera leaves. *Journal of Food Science*, 78(9). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12233>
- Leone, A., Fiorillo, G., Criscuoli, F., Ravasenghi, S., Santagostini, L., Fico, G., Spadafranca, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Pozzi, F., Di Lello, S., Filippini, S., & Bertoli, S. (2015). Nutritional characterization and phenolic profiling of moringa oleifera leaves grown in chad, sahwari refugee camps, and Haiti. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18923–18937. <https://doi.org/10.3390/ijms160818923>
- Moringa oleifera* - Horseradish Tree PKM2 - Seeds. (n.d.). Retrieved December 9, 2019, from <http://www.tradewindsfruit.com/moringa-oleifera--seeds>
- Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>
- Propiedades del agua*. (n.d.). Retrieved January 11, 2020, from [http://laplace.us.es/wiki/index.php/Propiedades\\_del\\_agua](http://laplace.us.es/wiki/index.php/Propiedades_del_agua)
- Rajbhar, K., Dawda, H., & Mukundan, U. (2015). Polyphenols: Methods of Extraction. *Sci. Revs. Chem. Commun*, 5(1), 1–6. [www.sadgurupublications.com](http://www.sadgurupublications.com)
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from Moringa oleifera Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.002>
- Sandoval Arreola M. (2013). Moringa oleifera una alternativa para sustituir coagulantes metálicos en el tratamiento de aguas superficiales. In *Ingeniería*.
- Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
- Tobias, L. (2010). ARTÍCULO DE REVISIÓN Moringa oleifera el árbol de la nutrición Moringa oleifera the tree of nutrition. 2(1), 130–138.
- Vats, S., & Gupta, T. (2017). Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of Moringa oleifera Lam. from Rajasthan, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(1), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0407-6>