

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**Influencia de Tres Métodos de Concentración y Secado en el
Contenido de Vitamina C y Eficiencia Antioxidante del Extracto de
las Hojas de *Moringa oleifera***

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Kenia Isamara Martínez Ruíz

Br. Geniel Andrés Talavera Blandón

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR

Ing. Juan Alonso Santos

Managua, Nicaragua, mayo de 2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**Influencia de Tres Métodos de Concentración y Secado en el
Contenido de Vitamina C y Eficiencia Antioxidante del Extracto de
las Hojas de *Moringa oleifera***

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

**Br. Kenia Isamara Martínez Ruíz
Br. Geniel Andrés Talavera Blandón**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR

Ing. Juan Alonso Santos

Managua, Nicaragua, mayo de 2018

DEDICATORIA

A nuestros Padres.

AGRADECIMIENTOS

Este logro lo agradecemos a Dios.

OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

El presente trabajo de diploma: “Influencia de Tres Métodos de Concentración y Secado en el Contenido de Vitamina C y Eficiencia Antioxidante del Extracto de las Hojas de *Moringa oleifera*”, presentado por los Brs. Kenia Martínez Ruíz y Geniel Talavera Blandón, es un estudio novedoso y pertinente desarrollado en nuestra Facultad, relacionado con antioxidantes naturales obtenidos de una fuente rica en nutrientes.

La planta de *Moringa* está considerada como un súper-alimento puesto que contiene numerosos macro y micro nutrientes esenciales e importantes en la dieta. Se ha usado en otros países para combatir la malnutrición en zonas con altos índices de pobreza como Ghana, Etiopía y Somalia. Comercialmente ya son muchas las utilidades que se buscan aprovechar de esta planta, dentro de ellas, la preparación de concentrados de *Moringa* para ser usados como suplemento alimenticio.

En este estudio se planteó determinar el efecto de distintos métodos de concentración que se utilizan para la extracción de los nutrientes principales de manera que se pueda inferir en cuán efectivo es cada método para conservar los nutrientes evitando en mayor medida la degradación de éstos, de forma que los suplementos de *Moringa* puedan conservar mejor su efectividad nutritiva.

En el desarrollo de este estudio, los Bachilleres Martínez y Talavera realizaron una exhaustiva búsqueda bibliográfica de artículos, bases de datos científicas y libros relacionados con el tema para fundamentar adecuadamente el marco de referencia de esta investigación. Además, el trabajo se basó en métodos propuestos en artículos científicos de gran impacto para llevar a cabo los análisis cinéticos y de eficiencia antioxidante para poder determinar el efecto de las etapas de concentración y secado sobre la afectación de las cualidades nutritivas y antioxidantes del extracto de hojas de *Moringa*.

Durante la realización de la monografía, los Brs. Martínez y Talavera demostraron iniciativa para resolver problemas, adquirieron nuevas competencias y destrezas y además aplicaron gran parte de los conocimientos adquiridos en la carrera de Ingeniería Química, destacando que este trabajo consolida varias áreas de formación del Programa como son operaciones de transferencia de masa, cinética y modelación, análisis instrumental e ingeniería de los alimentos, entre otras.

Es de mi agrado manifestar que este documento cumple con los requisitos académicos que exige un trabajo de diploma y además puedo dar fe de que el éxito del mismo se consolidó principalmente gracias a la iniciativa, dedicación y compromiso de los autores.

Por lo citado anteriormente, solicito a los honorables miembros del jurado dar su aprobación para que se le otorgue a los Bachilleres Kenia Martínez y Geniel Talavera el título de Ingeniero Químico.

Ing. Juan Manuel Alonso Santos

Tutor

RESUMEN

Moringa oleífera es una planta que contiene muchos nutrientes que se concentran principalmente en las hojas. Comúnmente, el proceso de separación de estos nutrientes involucra la extracción sólido-líquido seguida de evaporación y secado para obtener un extracto concentrado rico en proteínas, vitaminas, carbohidratos y otros nutrientes esenciales que pueden ser utilizados en la industria alimentaria.

En este trabajo se utilizaron tres métodos de concentración y secado, que implicaron condiciones de temperatura y presión muy diferentes, para evaluar el efecto de cada método sobre el contenido de vitamina C y la eficiencia antioxidante de los extractos.

Se llevaron a cabo extracciones sólido-líquido de las hojas (EH), empleando una solución de etanol (35% v / v) a 50 ° C durante 2 horas. Los extractos resultantes se concentraron y secaron i) en un horno convectivo (HC) a 100 ° C, y a una presión atmosférica de 750 mbar durante 8 horas, ii) en un evaporador de vacío (EV) a 50 ° C y a 300 mbar durante 2 horas y iii) en un liofilizador (SL) a -40°C y a 0.050 mbar durante 36 horas.

La eficiencia antioxidante de los sólidos secos se calculó mediante el método de inhibición de radicales libres empleando 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) a 517 nm, resultando en un valor de 2902.5 ± 14.8 para EH, $3433,1 \pm 85.2$ para SL, $3980,1 \pm 37.2$ para EV, y 8123.5 ± 263.3 para HC.

El rendimiento antioxidante calculado (EA, g DPPH/(mg de sólidos · min)) fue de 2.922×10^{-5} para EH, 2.888×10^{-5} para SL, 2.495×10^{-5} para EV, y 1.014×10^{-5} para HC. Además, el contenido de vitamina C (mg / L) determinado por HPLC fue 59.0 ± 0.3 para EH, 49.7 ± 0.6 para SL, 45.0 ± 0.4 para EV y 23.6 ± 0.7 para HC.

Los resultados indican que al concentrar en horno convectivo se degrada la vitamina C y la eficiencia antioxidante un 60% y 65.3% del valor inicial, respectivamente, mientras que al concentrar por evaporación al vacío en rotavapor un 23.7% y 14.6% y por liofilización un 15.8% y 1.2% respectivamente.

También se evaluó la reactividad de la mezcla de antioxidantes que contenía el extracto utilizando DPPH como generador de radicales libres, monitoreando la concentración de DPPH con respecto al tiempo, y posteriormente ajustando los datos cinéticos a un modelo bi-exponencial. La constante k_2 se calculó con los parámetros del modelo siendo 0.164 ± 0.005 (mg. mL⁻¹)⁻¹/s y esta constante se encuentra entre el rango de antioxidantes comerciales como el BHT y BHA.

ÍNDICE

Contenido	Página
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
III MARCO TEÓRICO	4
3.1 <i>MORINGA OLEIFERA</i>	4
3.1.1 <i>Cualidades Nutritivas</i>	4
3.1.2 <i>Propiedades Antioxidantes</i>	6
3.1.3 <i>Características Antimicrobianas</i>	7
3.2 ANTIOXIDANTES	7
3.2.1 <i>Vitamina C</i>	7
3.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFICIENCIA ANTIOXIDANTE.....	9
3.3.1 <i>Ensayos usados para determinar la capacidad antioxidante</i>	9
3.4 CINÉTICA DE REACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES NATURALES CON EL DPPH	13
3.4.1 <i>Modelos cinéticos</i>	13
3.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO O VITAMINA C	17
3.5.1 <i>Determinación por valoración</i>	17
3.5.2 <i>Determinación por espectrofotometría</i>	17
3.5.3 <i>Determinación por HPLC</i>	17
3.6 LIXIVIACIÓN	18
3.6.1 <i>Solventes usados en lixiviación de hojas de Moringa oleifera</i>	18
3.7 SECADO	18
3.7.1 <i>Secado por liofilización</i>	18
3.7.2 <i>Concentración por horno convectivo</i>	20
3.7.3 <i>Concentración por evaporación y secado al vacío</i>	21
IV HIPÓTESIS Y VARIABLES	23
V DISEÑO METODOLÓGICO	24
5.1 MATERIAL	24
5.1.1 <i>Preparación del material vegetal (Moringa oleifera)</i>	24
5.2 ETAPAS DEL PROCESO	24
5.2.1 <i>Separación Extracto-Solvente</i>	24
5.2.2 <i>Concentración y secado por rotavapor</i>	25
5.2.3 <i>Secado por Liofilización</i>	26
5.2.4 <i>Concentración y secado en horno convectivo</i>	27
5.3 DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS EFECTUADOS.....	27
5.4 DETERMINACIÓN DE VITAMINA C	27
5.4.1 <i>Curva de calibración con estándar (Vitamina C)</i>	27
5.4.2 <i>Determinación del contenido de vitamina C de extractos</i>	28
5.5 ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA ANTIOXIDANTE	29

5.5.1 Eficiencia antioxidante del ácido ascórbico.	30
5.5.2 Eficiencia antioxidante del extracto de las hojas de Moringa antes del de la concentración y secado.	31
5.5.3 Lixiviación	32
5.5.4 Concentración al vacío en rotavapor.....	33
5.5.5 Eficiencia antioxidante del extracto concentrado en horno convectivo.....	33
5.5.6 Eficiencia antioxidante del extracto secado por liofilización.	33
5.5.7 Eficiencia Antioxidante del extracto concentrado al vacío en rotavapor.	34
5.6 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE DPPH POR EXTRACTO DE HOJAS DE <i>MORINGA OLEIFERA</i>	34
5.6.1 Preparación de las concentraciones	34
5.6.2 Series experimentales a distintas concentraciones	35
5.6.3 Montajes del método y parámetros de elución.	35
5.6.4 Determinación de los parámetros del modelo y constante cinética k_2	35
5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	36
5.7.1 Cuantificación de Vitamina C	37
5.7.2 Análisis de la efectividad antioxidante	38
5.7.3 Estudio de la cinética de la reacción.....	39
VI ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	41
6.1 VITAMINA C	41
6.1.1 Análisis estadístico del contenido de vitamina C	41
6.1.2 ANOVA para el contenido de vitamina C.....	43
6.1.3 Determinación del contenido de vitamina C	46
6.2 EFICIENCIA ANTIOXIDANTE.....	46
6.2.1 Análisis estadístico de la capacidad antioxidante.....	46
6.2.2 Eficiencia antioxidante del ácido ascórbico	51
6.2.3 Curva de calibración de la concentración de DPPH versus absorbancia.....	52
6.2.4 Eficiencia antioxidante del extracto de hojas de Moringa oleifera antes y después de los métodos de concentración y secado.	53
6.3 EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE LA HOJA DE <i>MORINGA OLEÍFERA</i> FRENTE AL RADICAL LIBRE DPPH, A PARTIR DE LA DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD K_2	55
VII CONCLUSIONES.....	61
VIII RECOMENDACIONES	62
IX NOMENCLATURA.....	63
X BIBLIOGRAFÍA.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Composición de nutrientes de hojas frescas, hojas secas, hojas en polvo, semilla y vainas de la <i>Moringa oleífera</i> en base a 100 gramos de material. Datos extraídos del estudio realizado por Gopalakrishnan <i>et al.</i> (2016).	5
Tabla 3.2 Contenido de ácido ascórbico en diferentes partes de la <i>Moringa</i> , (mg/100 g de muestra tomada). Información tomada del estudio realizado por Ahmed <i>et al.</i> (2015).	5
Tabla 3.3 Constantes de velocidad obtenidas experimentalmente por diferentes autores. Valores tomados de la investigación de Villanueva-Tiburcio <i>et al.</i> (2010).	16
Tabla 3.4 Diferencia entre secado convencional y liofilización.....	20
Tabla 5.1 Soluciones preparadas para el análisis de eficiencia antioxidante	31
Tabla 5.2 Diseño experimental para análisis de Vitamina C.....	37
Tabla 5.3 Diseño experimental para análisis de efectividad antioxidante.....	38
Tabla 5.4 Diseño Experimental para análisis cinético de la reacción de antioxidantes con el DPPH.....	40
Tabla 6.1 Pruebas de normalidad para los datos obtenidos de vitamina C	41
Tabla 6.2 Prueba de homogeneidad de varianzas para los datos de vitamina C	41
Tabla 6.3 ANOVA para vitamina C	43
Tabla 6.4 Prueba Post-Hoc para el análisis de vitamina C.....	44
Tabla 6.5 Resultados de la determinación del contenido del ácido ascórbico	46
Tabla 6.6 Pruebas de normalidad para EA de los extractos de hojas de <i>Moringa oleífera</i>	47
Tabla 6.7 Prueba de homogeneidad de varianzas.....	47
Tabla 6.8 Tabla ANOVA para los datos obtenidos de EA de cada tratamiento.....	49
Tabla 6.9 Prueba post hoc para EA entre los distintos tratamientos	49
Tabla 6.10 Parámetros estimados del ensayo de DPPH.....	55
Tabla 6.11 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos del ensayo 1.	57
Tabla 6.12 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la primera réplica	57
Tabla 6.13 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la segunda réplica.....	57
Tabla 6.14 Parámetros obtenidos de la relación entre Kobs y concentración inicial de extractos	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Métodos de determinación del contenido de nutrientes y antioxidantes. Información extraída de los estudios hechos por Asante <i>et al.</i> (2014) y Ahmed <i>et al.</i> (2015).	6
Figura 3.2 Estructura de la Vitamina C tomada de Rowe <i>et al.</i> (2009).....	7
Figura 3.3 Molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). Estructura extraída de la investigación realizada por Leal-Alturo (2012).....	10
Figura 3.4 Transición de coloración del Radical DPPH cuando reacciona con un antioxidante. Información proporcionada por Leal-Alturo (2012).	10
Figura 3.5 Espectro de absorción del DPPH en UV-VIS a 0.0250 g/L en etanol. Violeta: radical DPPH; Amarillo: DPPH reducido.	11
Figura 3.6 Determinación gráfica de los valores EC_{50} y t_{EC50} del comportamiento cinético de estándares antioxidantes (concentraciones expresadas en g antioxidante kg^{-1} DPPH): a) ácido ascórbico; b) α -tocoferol. Información obtenida del artículo publicado por Sánchez-Moreno <i>et al.</i> (1998).	12
Figura 3.7 Disminución de la concentración de DPPH en presencia de un antioxidante a diferentes concentraciones a) α -tocopherol b) Black chokeberry (Aronia) c) Butil hidroxitolueno (BHT).(Espín <i>et al.</i> , 2000).....	15
Figura 3.8 Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden k_{obsd} de la concentración de antioxidantes (\bullet) α -tocopherol, (\diamond) Black chokeberry (Aronia) y (\circ) BHT.(Espín <i>et al.</i> , 2000)	14
Figura 3.9 Ejemplo típico de un comportamiento bi-exponencial de los datos cinéticos: estabilidad de la enzima lipasa en un medio orgánico. (Aymard y Belarbi, 2000)	16
Figura 5.1 Diagrama de las etapas del proceso	25
Figura 5.2 Esquema del montaje del sistema para secado del extracto al vacío usando un evaporador rotatorio	26
Figura 5.3 Modelo del liofilizador que se utilizó para el secado por sublimación.....	26
Figura 5.4 Diagrama de análisis y determinación de parámetros.....	28
Figura 5.5 Diagrama del Horno donde se realizó el secado convectivo	30
Figura 5.6 Diagrama del Baño de Agua con Agitación y Calentamiento que se usará para la extracción de las hojas de <i>Moringa</i> con 35% etanol y 65% de agua.....	32
Figura 6.1 Q-Q normal del contenido de vitamina C para los diferentes extractos.	42
Figura 6.2 Media de vitamina C vs el método de concentración y secado	45
Figura 6.3 Vitamina C vs Método de concentración y secado	45
Figura 6.4 Q-Q normal de Eficiencia Antioxidante para los diferentes extractos a) Extracto de las hojas, b) Secado por liofilización, c) concentración y secado por rotavapor, d) Concentración y secado por horno.....	48

Figura 6.5 Media de las eficiencias antioxidantes versus método de secado	50
Figura 6.6 Eficiencia antioxidante vs método de secado.....	51
Figura 6.7 Datos cinéticos del Ácido ascórbico a diferentes concentraciones frente a DPPH con una concentración de 0.025 mg/mL.	52
Figura 6.8 Correlación lineal entre la concentración de DPPH [·] y absorbancia a 517 nm.	53
Figura 6.9 Comportamiento de datos experimentales obtenidos de la reacción entre los diferentes extractos contra DPPH (a) Extracto antes de la concentración y secado, (b) Extracto secado por liofilización, (c) Extracto concentrado al vacío mediante rota vapor, (d) Extracto concentrado por horno convectivo.	54
Figura 6.10 Comportamiento de datos experimentales para la reacción entre la mezcla de antioxidantes contenidos en el extracto de hojas de <i>Moringa oleífera</i> frente a DPPH.	56
Figura 6.11 Ajuste de los datos obtenidos al monitorear la reacción del extracto de las hojas de <i>Moringa oleífera</i> contra DPPH, usando un modelo bi-exponencial. (Los puntos representan los datos y la línea el ajuste).....	56
Figura 6.12 Comportamiento cinético de los datos experimentales en los cuales se observan los dos periodos de decaimiento exponencial representados por kobs1 y kobs2.....	58
Figura 6.13 Relación de la constante de pseudo primer orden y la concentración inicial del extracto de la hoja de <i>Moringa oleífera</i> . Donde a), b) y c) son el ensayo y sus réplicas.	59

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el objetivo de muchas investigaciones en el área de la biotecnología y la industria de alimentos es lograr que los compuestos bioactivos o nutraceuticos presentes en los vegetales se conserven o sufran modificaciones mínimas durante el procesamiento y almacenamiento, conservando su valor nutricional y sus propiedades. Fruto de la innovación en la industria alimenticia, se han implementado nuevas tecnologías en operaciones unitarias como el secado por liofilización para la conservación de estos compuestos de interés.

Operaciones unitarias como la evaporación, deshidratación y secado son unas de las más usadas en la industria de procesos, ya que permite la remoción de la humedad contenida en una mezcla líquida con sólidos disueltos o un sólido húmedo. En general, la separación de esta humedad se realiza por evaporación, sin embargo, el calor empleado para secar los alimentos o productos, altera las características organolépticas y provoca pérdidas del valor nutritivo.

Actualmente hay disponibles una amplia variedad de secadores con distintas características. Algunos funcionan al vacío, otros con temperaturas muy elevadas e incluso hay otros con temperaturas muy bajas; de ahí la importancia de saber cuál de los tipos de secadores (donde cada tipo involucra un método diferente de concentración y secado) resulta apropiado utilizar considerando tanto la conservación de los nutrientes como los costos operativos y del equipamiento.

El *marango* o *Moringa* (*Moringa oleifera*) es una planta cuyo cultivo ha incrementado en años recientes en nuestro país, debido a que estudios previos demuestran que dicha planta es rica en proteínas, vitaminas e incluso contiene una alta cantidad de antioxidantes. Por lo tanto, puede ser utilizada para elaborar productos alimenticios con excelentes características nutritivas. Cabe destacar que la semilla, tallo, y hojas se han estudiado por separado encontrando en cada parte características distintas.

El extracto de hojas de *Moringa oleifera* contiene una gran variedad de sustancias antioxidantes, las cuales no podemos determinar ni cuantificar, lo que nos lleva a establecer como variable la eficiencia antioxidante (EA) del extracto, ya que mide el poder de todos los compuestos antioxidantes. Por otro lado, se sabe que la vitamina C es el antioxidante más eficiente, propensa a degradación en procesos térmicos y una de las que se encuentra en mayor cantidad, lo cual la hace un compuesto importante y de referencia, esto la convierte en una segunda variable de estudio.

Una vez obtenido el extracto de hojas de *Moringa oleifera* se hace necesaria una etapa de secado o concentración, debido a que si el extracto permanece como una solución acuosa ocurre con facilidad la fermentación del mismo y también la elevada actividad acuosa y su riqueza en nutrientes facilita la proliferación de microorganismos y degradación de los mismos nutrientes, por lo que se debe remover el agua (concentrarlo) para tener un extracto seco el cual es más estable para su almacenamiento y posterior comercialización.

Es por ello que surge la necesidad de una investigación que permita evaluar el efecto que tienen las diversas condiciones de operación de tres tipos de concentración y secado en los extractos de la hoja de la *Moringa*, de manera que conserve sus propiedades nutritivas, donde la

evaluación del efecto se lleva a cabo comparando las propiedades de extractos secos con las de un extracto inicial (antes de ser concentrado).

La obtención de compuestos con propiedades nutritivas y antioxidantes es parte importante de la industria de alimentos y farmacéutica. La extracción sólido-líquido (lixiviación) y el secado son operaciones unitarias usadas comúnmente en estos casos. Ambas operaciones involucran a menudo el uso de temperaturas altas que degradan parcial o totalmente muchos nutrientes y antioxidantes de interés y reducen el potencial de los compuestos nutraceuticos o fitoterapéuticos en el producto final.

En el trabajo de Nazar *et al.* (2015) se obtuvieron extractos a partir de las hojas de *Moringa*, utilizando como solvente etanol, metanol, agua y éter de petróleo, con el fin de probar la capacidad antimicrobiana de cada tipo de extracto. Cada uno de los extractos mostró capacidad para inhibir ciertas bacterias excepto en el que se utilizó éter de petróleo como solvente. En este mismo estudio los solventes fueron separados usando Rotavapor. Este equipo se utilizó ya que permite trabajar a presiones y temperaturas bajas lo cual ayuda a la conservación de las propiedades, en este caso la actividad antimicrobiana se evaluó en este trabajo.

Se ha demostrado que las condiciones del método de secado en las hojas de *Moringa*, en especial la temperatura, es un parámetro importante y se debe de tomar en cuenta, ya que el trabajo realizado por Yang *et al.* (2006), compara el secado de las hojas en horno y secado de las hojas por liofilización, concluyendo que la vitamina C es afectada casi un 75% en horno a 50 Celsius en comparación a las hojas liofilizadas.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la afectación de la Vitamina C y la eficiencia antioxidante en el contenido de los extractos de hoja de *Moringa* luego de utilizar tres métodos de concentración y secado: concentración en horno convectivo (con temperaturas altas y presión atmosférica), concentración al vacío en rotavapor (temperatura media y presión baja) y secado por sublimación en liofilizador (con temperatura muy baja y presión muy baja), y de esta manera determinar cuál de los métodos es el más viable en la industria para la conservación de los compuestos de interés en la *Moringa*.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Evaluar tecnológicamente la influencia de tres tipos de concentración y secado (convectivo, al vacío y liofilización) en la degradación de vitamina C y eficiencia antioxidante del extracto de las hojas de *Moringa oleifera*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de tres métodos de concentración y secado del extracto de hojas de *Moringa oleifera* en el contenido de vitamina C de dicho extracto.
- Determinar el efecto de tres métodos de concentración y secado del extracto de hojas de *Moringa oleifera* en la eficiencia antioxidante de dicho extracto.
- Estudiar la cinética de degradación del DPPH, debido a la acción de los antioxidantes del extracto de hojas *Moringa*.
- Comparar la eficiencia de un antioxidante de referencia (ácido L-ascórbico) con la eficiencia antioxidante del extracto inicial y de los extractos obtenidos mediante los tres métodos de concentración y secado.

III MARCO TEÓRICO

3.1 Moringa oleifera

Moringa oleifera es un árbol nativo del norte de la India y la región sur asiática, que crece en regiones tropicales y subtropicales y se cultiva en muchas partes del mundo. La planta prospera mejor en las condiciones de clima tropical insular, puede crecer bien en los trópicos húmedos o tierras cálidas secas y aguanta bien las sequías (Moyo *et al.*, 2011).

3.1.1 Cualidades Nutritivas

Esta planta es rica en nutrientes debido a la presencia de una variedad de fitoquímicos esenciales presentes en sus hojas, vainas y semillas, también cuenta con un alto contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Algunas organizaciones no gubernamentales especialmente: *Trees for Life*, *Church World Service and Educational*, *Concerns for Hunger Organization*, califican la *Moringa oleifera* como una planta nutricional la cual ha sido usada para combatir la desnutrición en bebés y madres lactantes (Fahey, 2005).

Otro aspecto muy importante es que las hojas se pueden consumir frescas, cocinadas o se pueden almacenar por varios meses en forma de polvo con un previo proceso de secado sin refrigeración, conservando su valor nutricional; cabe destacar que esta planta es rica en vitaminas A, C, potasio, calcio, hierro y la calidad proteica compite con la de la leche y huevos (Devendra *et al.*, 2011).

La hojas contienen muchos micronutrientes, entre los cuales destaca la vitamina C presente en altas concentraciones (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Este es uno de los compuestos antioxidantes más significativos debido a que posee la mejor eficiencia antioxidante reportada entre todos los antioxidantes comunes (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998) que han sido encontrados en las hojas de *Moringa oleifera*.

Partes de la planta incluyendo hojas tallos, raíz, semilla, han sido reportadas como fuentes de diferentes compuestos bioquímicos con efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antioxidantes y antimicrobianos; encontrándose que contiene un bajo contenido de anti-nutrientes (compuestos naturales o sintéticos que interfieren con la adsorción de nutrientes) como taninos y oxalatos (Castillos, 2013, Devendra *et al.*, 2011).

La tabla 3.1 tomada de Gopalakrishnan *et al.* (2016) hace una comparación de la composición de nutrientes de hojas frescas, hojas secas, hojas en polvo, semilla y vaina de la planta de *Moringa*, en donde se puede apreciar la diferencia entre cada una de ellas, y notar que la vitamina C es uno de los nutrientes con mayor contenido en las hojas frescas.

Para que el extracto de *Moringa* sea preservado por un largo tiempo es necesario secarlo o concentrarlo, el secado por liofilización es un buen método para conservarlo sin pérdidas. Gopalakrishnan *et al.* (2016).

Una investigación realizada por Ahmed et al. (2016), indica que la composición de la hoja de *Moringa* varía con respecto al origen de la muestra y estado de maduración. Por otra parte, obtuvieron resultados acerca de la composición de vainas y flores (Tabla 3.2).

Tabla 3.1 Composición de nutrientes de hojas frescas, hojas secas, hojas en polvo, semilla y vainas de la *Moringa oleifera* en base a 100 gramos de material. Datos extraídos del estudio realizado por Gopalakrishnan et al. (2016).

Nutrientes	Hojas frescas	Hojas secas	Hojas en polvo	Semilla	Vainas
Calorías (cal)	92	329	205	-	26
Proteína (g)	6.7	29.4	27.1	35.97±0.19	2.5
Grasa (g)	1.7	5.2	2.3	38.67±0.03	0.1
Carbohidratos (g)	12.5	41.2	38.2	8.67±0.12	3.7
Fibra (g)	0.9	12.5	19.2	2.87±0.03	4.8
Vitamina B1 (mg)	0.06	2.02	2.64	0.05	0.05
Vitamina B2 (mg)	0.05	21.3	20.5	0.06	0.07
Vitamina B3 (mg)	0.8	7.6	8.2	0.2	0.2
Vitamina C (mg)	220	15.8	17.3	4.5±0.7	120
Vitamina E (mg)	448	10.8	113	751.67±4.41	-
Calcio (mg)	440	2185	2003	45	30
Magnesio (mg)	42	448	368	635±8.66	24
Fósforo (mg)	70	252	204	75	110
Potasio (mg)	259	1236	1324	-	259
Cobre (mg)	0.07	0.49	0.57	5.20±0.15	3.1
Hierro (mg)	0.85	25.6	28.2	-	5.3
Azufre (mg)	-	-	870	0.05	137

Tabla 3.2 Contenido de ácido ascórbico en diferentes partes de la *Moringa*, (mg/100 g de muestra tomada). Información tomada del estudio realizado por Ahmed et al. (2015).

Nº de muestra	Hojas tiernas	Hojas maduras	Flores	Vainas
T-1	65.105	51.226	77.502	3.960
T-2	105.967	115.729	192.842	7.261
T-3	62.660	74.909	156.368	7.792
T-4	94.281	102.867	176.828	7.923
T-5	102.079	104.225	174.933	8.050
T-6	143.587	150.157	224.672	8.270

3.1.2 Propiedades Antioxidantes

La *Moringa oleifera* es una fuente rica en antioxidantes ya que existen estudios donde se reporta que el extracto de la hoja, fruta y semilla actúa como inhibidor de la oxidación causada por radicales libres. Durante un estudio acerca de las hojas de *Moringa* liofilizadas, con diferentes fuentes de extracción, se encontró que los extractos con metanol y etanol (como solventes) de *Moringa oleifera* originaria de la India tiene alta actividad antioxidante. En otro reciente estudio se comparó el aceite de palma con la semilla de *Moringa* por su alto potencial de antioxidante, y se descubrió que las semillas de *Moringa* son superiores por la captación de radicales (Farooq *et al.*, 2012).

Existen una gran variedad de antioxidantes contenidos en el la *Moringa oleifera*. Guzmán-Maldonado *et al.* (2015) encontró algunos antioxidantes tales como: vitamina C, vitamina E, compuestos fenólicos y taninos.

En la figura 3.1 se muestran los nutrientes y antioxidantes como dos grupos diferentes, los cuales tienen algunos compuestos en común. La vitamina C y E son compuestos que se catalogan nutrientes y al mismo tiempo cumple la función de antioxidantes.

Es de interés para la biotecnología e industria alimenticia conocer la degradación de nutrientes y antioxidantes después de someter un producto a procesos térmicos. Para conocer el contenido de nutrientes se puede determinar el contenido de vitamina C, ya que esta vitamina es el nutriente que se degrada con más facilidad y esto nos permite inferir en los demás nutrientes, y para conocer el contenido de antioxidantes se puede realizar le prueba del secuestro de radicales utilizando DPPH.

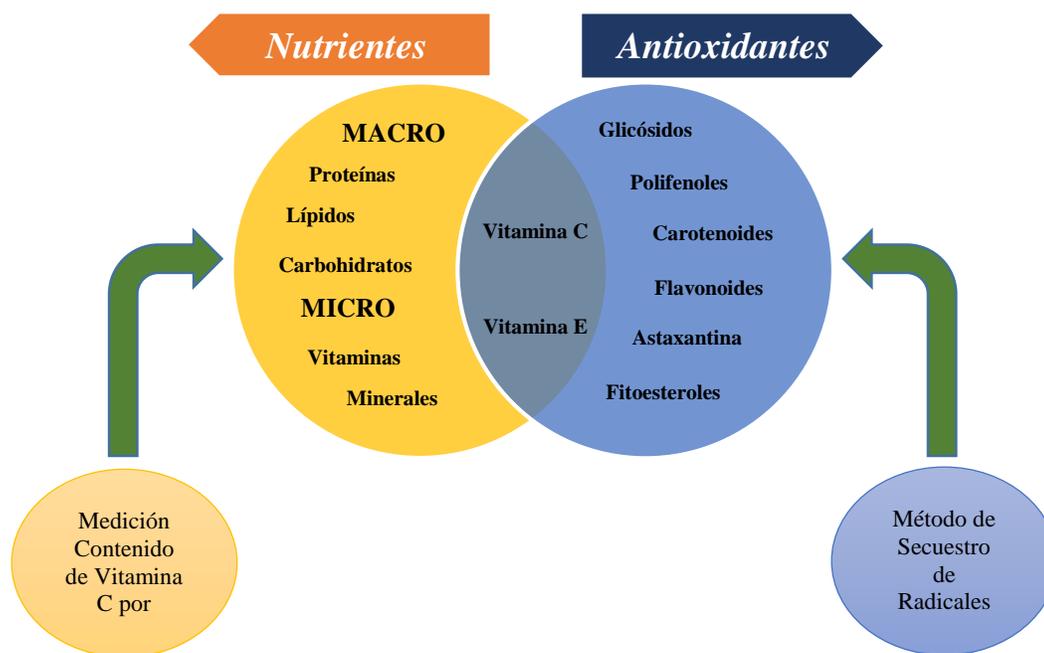


Figura 3.1 Métodos de determinación del contenido de nutrientes y antioxidantes. Información extraída de los estudios hechos por Asante *et al.* (2014) y Ahmed *et al.* (2015).

3.1.3 Características Antimicrobianas

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema global; por lo tanto, se han implementado estrategias para la búsqueda de innovadores antimicrobianos, en ellas se ha encontrado que los metabolitos secundarios de las hojas de la *Moringa* han mostrado efectos antimicrobianos en contra de varias bacterias patogénicas incluyendo *Shigella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Bacillus* (Devendra *et al.*, 2011, Castillos, 2013).

Según Farooq *et al.* (2012) se realizó un estudio donde se determinó la actividad antimicrobiana del extracto de semillas, hojas, y flores, utilizando agua, éter, y alcohol por método de dilución y macro dilución, haciendo uso de agar.

3.2 Antioxidantes

Un antioxidante puede ser definido como una sustancia que, estando presente a bajas concentraciones, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de un sustrato.

Los antioxidantes han sido divididos en dos clases, primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios pueden retrasar o inhibir la etapa de iniciación por reacción con un radical lípido o inhibir la propagación por reacción con radicales peroxilo y alcoxilo; y los secundarios son compuestos que retardan la velocidad de oxidación (Antolovich *et al.*, 2002).

3.2.1 Vitamina C

La vitamina C o L-ácido ascórbico (AA), es una vitamina esencial y un importante agente hidrosoluble, que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa, mediante una serie de reacciones enzimáticas. El AA (C₆H₈O₆) tiene un peso molecular de 176.13 g/mol y posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras.

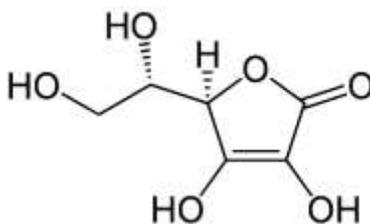


Figura 3.2 Estructura de la Vitamina C tomada de Rowe *et al.* (2009).

Murtaza *et al.* (2004) estudió el contenido de vitamina C en una bebida de fresa la cual almacenó por diferentes tiempos y temperaturas, llegando a la conclusión que la muestra almacenada a bajas temperatura tuvo la menor pérdida de ácido ascórbico.

La vitamina C es reconocida como uno de los mejores antioxidantes, y uno de los nutrientes más sensitivos al calor, por lo tanto, se utiliza como marcador de la pérdida de otros nutrientes, permitiendo hacer comparación de la calidad nutricional de alimentos antes y después del procesamiento. La degradación de la vitamina C también está relacionada con la pérdida del sabor debido a reacciones de oxidación como el pardeamiento enzimático en los alimentos. Existen factores importantes a tomar en cuenta la degradación del ácido ascórbico tales como etapas del procesamiento, tiempo y la temperatura de almacenamiento.

Talcott *et al.* (2003) fortificó jugo hecho de maracuyá con vitamina C y sacarosa. Los jugos fueron almacenados por 28 días a 37 grados Celsius. Después de 14 días de almacenamiento, el ácido ascórbico fue degradado completamente y se observó el efecto de pardeamiento.

3.1.3.1 Características anti-fúngicas

Muchos de los estudios que se han hecho acerca de las propiedades anti fúngicas de los extractos de la *Moringa oleifera*, se han realizado variando el tipo de solvente, para evaluar la capacidad de inhibición en contra de hongos como *Candida albicans*, que es un hongo diploide que existe en forma de levadura. Este fue probado con el ensayo de micro dilución. (Ndhlala *et al.*, 2014).

Muchas investigaciones reportan actividad anti fúngica desde la resina y raíces de este árbol. También se ha estudiado el extracto de la semilla el cual ha inhibido fuertemente a *Aspergillus niger* seguida de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus nidulans* (Gopalakrishnan *et al.* (2016), Farooq *et al.* (2012)).

3.1.3.2 Características anti-bacteriales

La actividad antimicrobiana ha sido probada en muchos estudios, analizando todas las partes del árbol, tales como resina, raíces y semillas, tomando en cuenta varios tipos de solvente.

Moringa oleifera se evaluó en contra de cepas de bacterias tales como Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*) obteniendo resultados satisfactorios. Estas pruebas se han hecho tomando en cuenta métodos como la micro dilución (Ndhlala *et al.*, 2014),(Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Este árbol contiene muchos componentes que han sido reportados como antibacteriales como 4-(4'-O-acetyl-a-L-rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate, 4-(a-L- rhamnopyranosyloxy) benzyl isothiocyanate, niazimicin, benzyl isothiocyanate, y 4-(a-L- rhamnopyranosyloxy) benzyl glucosinolate, Anthonine y Spirochin, pero uno de los componentes más importante y que juega un papel muy crucial, es el pterygosperma y este se encontró en la semilla según Farooq *et al.* (2012).

También existen estudios donde se compara la actividad microbiana de las bacterias (*Pasturella multocida*, *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*) revelando que *Pasturella multocida* y *B. subtilis* fueron las cepas más sensibles e influenciada por cationes (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+}), otra comparación relativa es la eficacia de la extracción de los compuestos de la *Moringa oleifera*

por arrastre de vapor en contra de *E. coli*, que es la bacteria más inhibida seguida de *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* (Farooq *et al.*, 2012).

3.3 Medición de la Actividad y Eficiencia Antioxidante

En 1958 la capacidad que tiene el DPPH para aceptar un electrón fue demostrada por Blois, tomando en cuenta las concentraciones de antioxidantes necesarias para reducir la concentración de DPPH inicial al 50%, a este método lo llamo, capacidad antioxidante. Posteriormente Sanchez-Moreno *et al.* (1998) modificó la ecuación tomando en cuenta no solo las concentraciones de antioxidantes, sino el tiempo que se necesita la reacción para estabilizarse.

3.3.1 Ensayos usados para determinar la capacidad antioxidante

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales, y según la reacción que involucran, pueden ser ensayos que incluyen reacciones en la que se transfiere un electrón o un átomo de hidrógeno.

El ensayo enfocado en la transferencia de un electrón se basa en una reacción de reducción en la que el sustrato toma un electrón del compuesto antioxidante (agente reductor). La reducción del sustrato oxidante causa una alteración de color que se utiliza como medida del avance de la reacción y de la capacidad antioxidante de la muestra.

Según Beltran (2010), algunos de los métodos que se basan en esta reacción son: el ensayo de la capacidad secuestrante del radical ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotialin)-6-sulfónico), también llamado ensayo de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC); el ensayo del poder reductor del ion férrico (FRAP); ensayo de la capacidad reductora del Cu y el método de la capacidad secuestrante del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), siendo éste el más sencillo y económico de los anteriores. Debido a estas razones, el método de la capacidad captadora de a llevarse a cabo en la parte experimental es éste.

3.3.1.1 Método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil)

Este método fue propuesto por Blois (1958), en el cual se demostró por primera vez la capacidad libre de DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (figura 5.3), es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual tiene un máximo de absorbancia en etanol a 517 nm.

Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tovar, 2013).

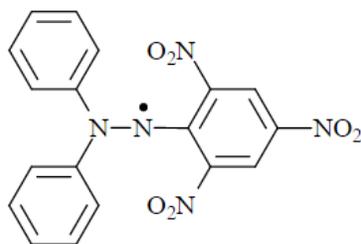


Figura 3.3 Molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). Estructura extraída de la investigación realizada por Leal-Alturo (2012).

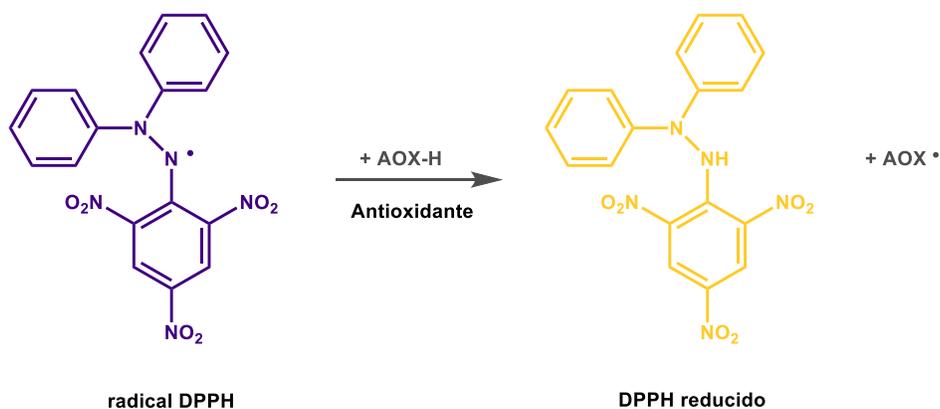


Figura 3.4 Transición de coloración del Radical DPPH cuando reacciona con un antioxidante. Información proporcionada por Leal-Alturo (2012).

La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (EC_{50}), definida como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros, el valor EC_{50} cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH (Antolovich *et al.*, 2002).

3.3.1.2 Cálculo de la eficiencia antioxidante

El cálculo de la capacidad antioxidante por radicales libres se había hecho mediante la ecuación siguiente (Blois, 1958):

$$AC = \frac{1}{EC_{50}} \quad (3.1)$$

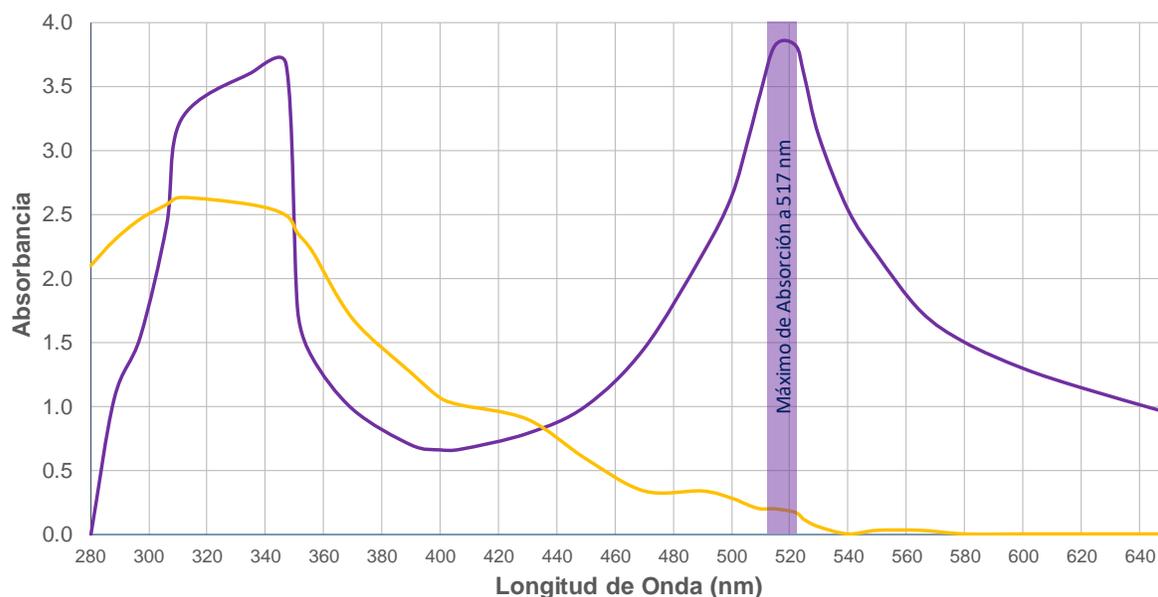


Figura 3.5 Espectro de absorción del DPPH en UV-VIS a 0.0250 g/L en etanol. Violeta: radical DPPH; Amarillo: DPPH reducido.

Dicha ecuación fue modificada por Sánchez-Moreno *et al.* (1998), quien tomó en cuenta el tiempo necesario para alcanzar la concentración EC_{50} , ya que considerando ambos parámetros: EC_{50} y $t_{EC_{50}}$ se describe mejor las cualidades de un antioxidante. De este modo se propone un nuevo parámetro llamado eficiencia anti-radical (EA). Combinando los dos factores mencionados, se obtiene:

$$EA = \frac{1}{EC_{50} \times t_{EC_{50}}} \quad (3.2)$$

Mientras mayor es valor de EC_{50} , más cantidad de antioxidante se necesita para neutralizar los radicales libres. Asimismo, mientras mayor sea el tiempo $t_{EC_{50}}$, más lenta es la cinética de

inhibición de los radicales libres. Por lo tanto, mientras mayores sean ambos parámetros, menor será la eficiencia antioxidante. Menores tiempos y menores concentraciones efectivas serán reflejo de un antioxidante más eficiente. De todos los antioxidantes estudiados en el trabajo de Sánchez-Moreno *et al.* (1998), la vitamina C presentó la mejor eficiencia antioxidante.

A continuación se muestra la figura 3.6 realizada por Moreno *et al.* (1997), en la cual se observa el comportamiento del porcentaje de remanencia de DPPH con respecto al tiempo para distintas concentraciones de vitamina C (izquierda) y vitamina E (derecha).

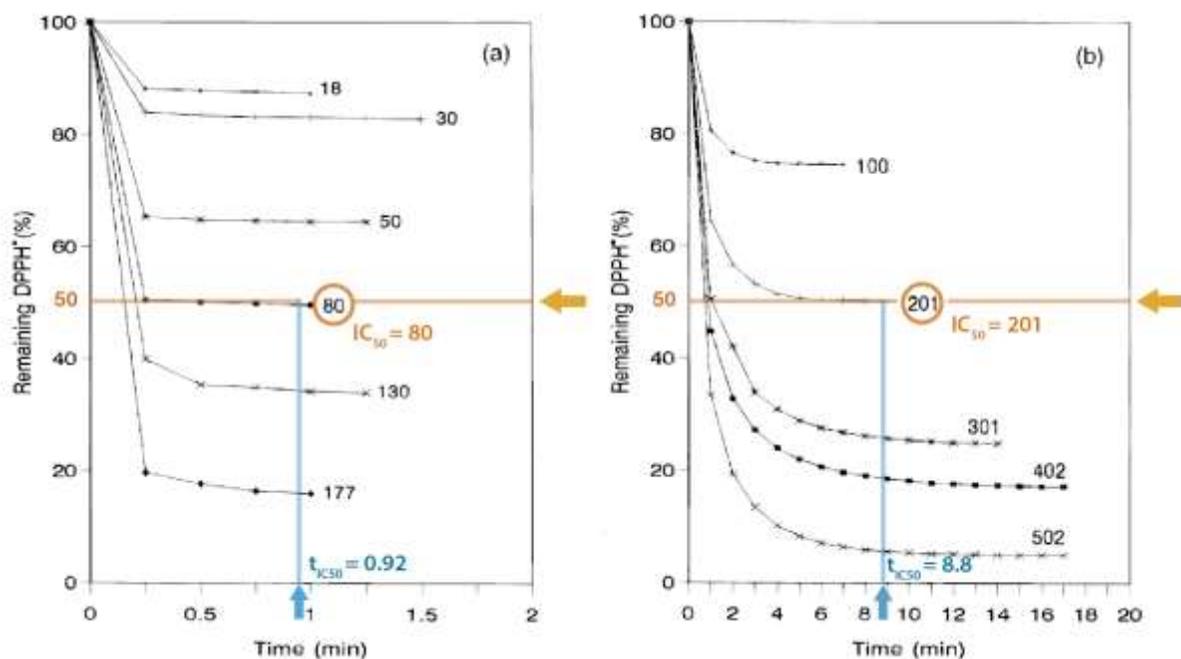


Figura 3.6 Determinación gráfica de los valores EC_{50} y t_{EC50} del comportamiento cinético de estándares antioxidantes (concentraciones expresadas en g antioxidante kg^{-1} DPPH): a) ácido ascórbico; b) DL- α -tocoferol. Información obtenida del artículo publicado por Sánchez-Moreno *et al.* (1998).

Horizontalmente se indica cómo se realiza la determinación del valor EC_{50} , el cual es la medida de la capacidad antioxidante. En este caso se realizan varias pruebas cinéticas a distintas concentraciones del antioxidante, hasta encontrar la concentración efectiva que disminuye la absorbancia inicial del DPPH al 50%. En el ejemplo de la figura 5.6, tomado de (Sánchez-Moreno *et al.* (1998)), se indicó con una línea la curva que disminuye al 50% el DPPH inicial, siendo las curvas de 80 g/kg DPPH para la Vitamina C y 201 g/kg DPPH para la Vitamina E los valores de EC_{50} determinados para estas vitaminas respectivamente.

La determinación del t_{EC50} se realiza una vez se encuentra la curva de EC_{50} . El t_{EC50} será el tiempo en el cual se alcanzó un valor constante en la curva de disminución de la concentración inicial de DPPH al 50%. En la figura 5.6 se indica con una línea vertical la identificación gráfica de este tiempo el cual, según estas condiciones experimentales, es aproximadamente de 0.92 y 8.8 minutos para la vitamina C y E, respectivamente.

3.4 Cinética de reacción de los antioxidantes naturales con el DPPH

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de ellas que tienen uno o más electrones desapareados que las convierten en altamente reactivos. Estos radicales son susceptibles de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso que se caracteriza por la transferencia de un átomo de hidrógeno proporcionado por agente oxidante.

Existen estudios cinéticos que avalan que los procesos entre DPPH y antioxidantes ocurren a través de reacción de pseudo primer orden, la que puede evaluarse midiendo la disminución de la absorbancia en función de tiempo para posteriormente calcular la constante de velocidad (Guija-Poma *et al.*, 2015).

3.4.1 Modelos cinéticos

Generalmente al graficar las absorbancias y tiempo se puede observar dos fases, una primera con reacción muy rápida, y una segunda de proceso lento, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de reacción, reacciones entre los productos o a la mezcla de antioxidantes en el extracto, ya que los extractos contienen una variedad de antioxidantes, unos con más eficiencia antioxidantes que otros (Guija-Poma *et al.*, 2015). Por lo cual en dependencia del decaimiento de la curva generada se puede ajustar los datos a una función exponencial de uno, dos y tres términos.

3.4.1.1 Modelo Mono-exponencial

Estudios de la cinética entre DPPH y antioxidantes como fenoles y antocianinas se han llevado a cabo siguiendo un modelo mono-exponencial en el ajuste de los datos obtenidos de concentración y tiempo para obtener la siguiente ecuación:

$$[DPPH] = [DPPH]_0 e^{-k_{obs} \cdot t} \quad (3.3)$$

Donde $[DPPH]$ es la concentración en el tiempo de DPPH, $[DPPH]_0$ es la concentración inicial de DPPH en $t = 0$, y k_{obs} es la constante de pseudo primer orden.

De la ecuación mostrada a continuación:

$$\ln [DPPH] = \ln [DPPH]_0 - k_{obs} \cdot t \quad (3.4)$$

Se calcula la constante de pseudo primer orden k_{obs} , esta constante es linealmente dependiente de la concentración de antioxidantes, y de la pendiente de la recta graficada se obtiene la constante de velocidad de segundo orden (k_2), esta constante es utilizada para el cálculo de la eficiencia antioxidante de diferentes compuestos (Suja *et al.*, 2004).

En las figuras 3.7 y 3.8 provenientes del estudio de Espín *et al.* (2000) se muestra el ajuste mono exponencial de la concentración de DPPH con respecto al tiempo y la dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden de la concentración inicial de tres compuestos antioxidantes, respectivamente.

3.4.1.2 Modelo Bi-Exponencial

Según Foti *et al.* (2016) el modelo exponencial de dos términos se emplea cuando no es posible ajustar los datos experimentales a un modelo mono exponencial, existen tres posibles razones: la mezcla de antioxidantes, dimerización, o reacción entre los productos.

El modelo generalizado se muestra en la siguiente ecuación:

$$A_t = \alpha \cdot e^{-\delta_1 t} + \beta \cdot e^{-\delta_2 t} \quad (3.5)$$

Donde t es el tiempo, A_t es la absorbancia en cualquier tiempo, δ_1 y δ_2 son constantes de pseudo primer orden en donde en todos los casos $\delta_1 > \delta_2$, A_0 la absorbancia en tiempo cero, $\alpha + \beta = A_0$.

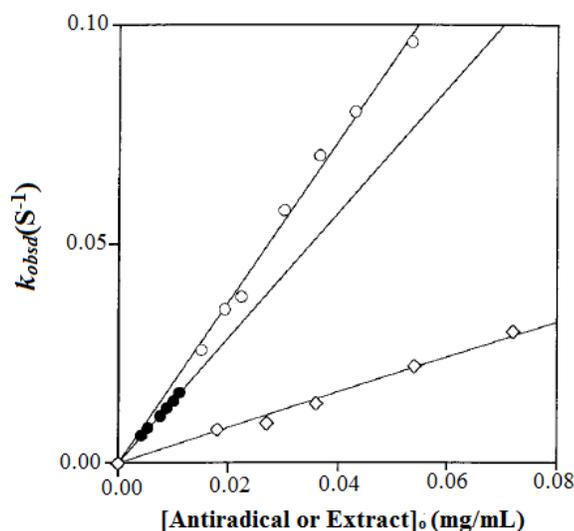


Figura 3.7 Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden k_{obsd} de la concentración de antioxidantes (•) α -tocopherol, (◊) Black chokeberry (Aronia) y (○) BHT. (Espín *et al.*, 2000).

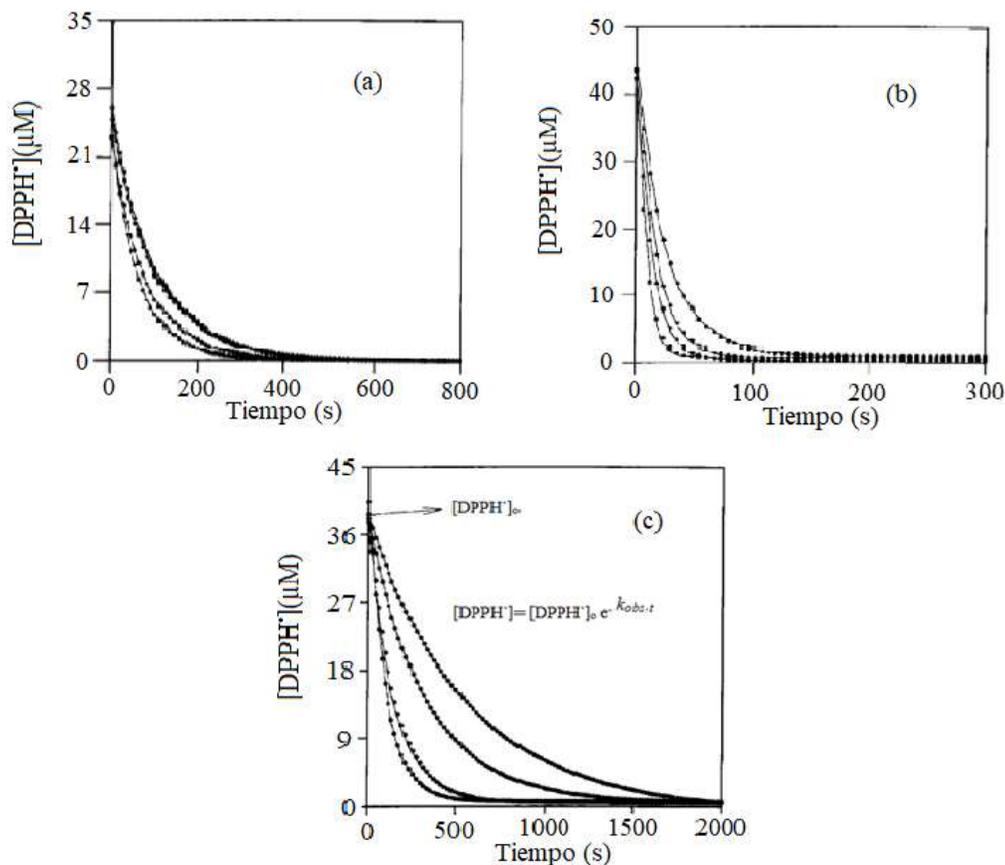


Figura 3.8 Disminución de la concentración de DPPH en presencia de un antioxidante a diferentes concentraciones a) α -tocopherol b) Black chokeberry (Aronia) c) Butil hidroxitolueno (BHT). (Espín *et al.*, 2000).

Se han hecho estudios acerca de la actividad antioxidante del coumarins (*2H-chromen-2-one*) usando DPPH, siguiendo la absorbancia del DPPH a diferentes concentraciones por 600 segundos, el perfil de la cinética de desaparición del DPPH mostro un decaimiento que analizaron en dos fases. La absorbancia decrece muy rápidamente en los primeros segundos, seguido de un proceso mucho más lento.

Según Vianna *et al.* (2012) estos tipos de perfiles implican la presencia de dos más compuestos con diferentes reactividad, la multiplicidad de reactivos fue tomada en cuenta con un ajuste de decaimiento de una función exponencial.

En otra investigación, se analizó el ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico y ácido caféico con el fin de calcular la constante de velocidad de segundo orden. Este estudio se llevó acabo ajustando los datos a una función de decaimiento exponencial de dos términos.

Los valores de las constantes de velocidad calculadas para el ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico y ácido caféico fueron 0.025 ± 0.001 , 52 ± 3 , 3470 ± 130 , 2270 ± 270 estos valores multiplicados por $10^3 \text{ seg}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Campos *et al.*, 2012).

En la figura 3.9, se muestra el ajuste de datos mediante un modelo bi-exponencial (Aymard y Belarbi, 2000).

La tabla 3.3 tomada de Villanueva-Tiburcio *et al.* (2010) hace una comparación de las constantes de velocidad obtenidas experimentalmente, encontradas en diferentes investigaciones.

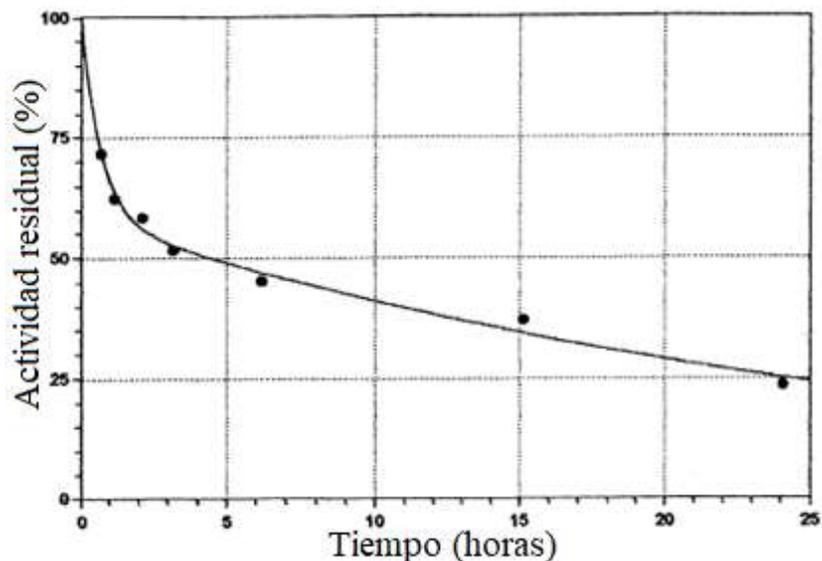


Figura 3.9 Ejemplo típico de un comportamiento bi-exponencial de los datos cinéticos: estabilidad de la enzima lipasa en un medio orgánico. (Aymard y Belarbi, 2000).

Tabla 3.3 Constantes de velocidad obtenidas experimentalmente por diferentes autores. Valores tomados de la investigación de Villanueva-Tiburcio *et al.* (2010).

Compuesto	Constante (k ₂)	Unidades de medida
Camu-camu maduro	1.32 ± 0.11	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
Camu-camu pinto	4.04 ± 0.18	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
Camu-camu verde	1.27 ± 0.02	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
Flavonas	1.2	L.mol ⁻¹ /s
Vitamina E	1.87	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
BHT	0.05	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
BHA	0.42	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
Té verde	2.3	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)
Zacate de Limón	0.06	(mg.mL ⁻¹) ⁻¹ /(s)

3.5 Determinación de ácido ascórbico o vitamina C

El ácido L-ascórbico es un importante agente antioxidante y una vitamina esencial hidrosoluble que se sintetiza químicamente a partir de la glucosa. Es un agente con una elevada capacidad reductora, tanto el ácido ascórbico como su forma oxidada (ácido L-dehidroascórbico), presentan actividad biológica y son interconvertibles por una reacción de oxidación-reducción (Romero, 2008).

3.5.1 Determinación por valoración

Es un método de análisis cuantitativo en el que se mide el volumen de una disolución de concentración conocida, la cual se puede llamar como disolución patrón o titulante patrón, necesario para reaccionar completamente con un compuesto en disolución de concentración desconocida. Para determinar cuándo se ha llegado al final de una titulación en la disolución problema se agrega un indicador que sufre un cambio apreciable de color en el punto final de la reacción.

Para que una sustancia se oxide es necesario que otra se reduzca, en este método la vitamina C tiene carácter reductor y se puede usar una disolución de yodo como agente oxidante que constituye el titulante patrón.

Existen diferentes métodos para determinar el ácido ascórbico, pero este método está propuesto como el más simple, ya que puede realizarse con instrumentos comunes en un laboratorio, y no incluye equipos costosos (Ciancaglioni *et al.*, 2001).

3.5.2 Determinación por espectrofotometría

Este método ha sido utilizado para la determinación de la vitamina C, ya sea en forma de ácido ascórbico o dehidroascórbico en frutas y vegetales. Este método está basado en la oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico con agua de bromo en presencia de ácido acético. Básicamente la concentración de ácido ascórbico se calcula como la diferencia entre el ácido dehidroascórbico inicial y las concentraciones de ácido ascórbico total (Kapur, 2012, Moeslinger *et al.*, 1995).

3.5.3 Determinación por HPLC

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil, la muestra en solución es inyectada en la fase móvil, los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar.

Según Sankhian (2013), se han realizado análisis de vitamina C a hojas frescas, tallo y hojas secas de *Moringa*; limón y limón dulce por espectrofotometría, valoración y cromatografía líquida, obteniendo resultados diferentes para cada material.

3.6 Lixiviación

La lixiviación, o extracción sólido-líquido, consiste en la separación de un componente (o grupo de componentes) que forman parte de un sólido, empleando un disolvente líquido adecuado en el que es insoluble el sólido, denominado inerte. La lixiviación es una de las operaciones más empleada en la industria alimenticia. Muchos productos orgánicos naturales se separan de sus estructuras originales mediante lixiviación. Treybal (1985).

3.6.1 Solventes usados en lixiviación de hojas de *Moringa oleífera*

Nazar *et al.* (2015) Realizó una investigación para obtener extracto de hoja de *Moringa oleífera*, usando agua, etanol, metanol y éter de petróleo, y al llevar a cabo dichos experimentos concluyó que el etanol es el que muestra un mejor resultado.

En otro estudio hecho por Valdés-Hernández *et al.* (2015), se evaluó el etanol como solvente a distintas concentraciones (40, 60, 80 %), temperatura (50, 60, 70°C), tiempo de extracción y relación soluto-disolvente (1:15, 1:25, 1:35 m/v) y encontró que no hay diferencia significativa entre las concentraciones, temperaturas, y el tiempo óptimo fueron 3 horas.

3.7 Secado

El secado constituye uno de los métodos que permite extraer la humedad de un sólido. En general, se entiende por secado la separación de un líquido contenido en un sólido, teniendo en cuenta que la fase de interés es el sólido, usualmente esta operación se da por evaporación en una corriente gaseosa.

Los fenómenos principales que se producen en una operación de secado son:

- a) Transferencia de energía (calor) de los alrededores para evaporar la humedad de la superficie.
- b) Transferencia de la humedad interna hacia la superficie del sólido.

3.7.1 Secado por liofilización

Ciertos materiales biológicos, farmacéuticos y productos alimenticios no pueden ser calentados, incluso a temperaturas moderadas en secados ordinarios; por lo tanto, podrían ser secados en frío (por liofilización).

En este método de secado, la sustancia a secar es generalmente congelada por la exposición al aire muy frío.

En el secado por congelación, el agua u otro solvente es removido como vapor por sublimación del material congelado en una cámara de vacío, después que el solvente se sublima a un vapor, éste se retira por bombas de vacío mecánica.

Al secar en frío, se obtiene un producto de una calidad más alta que del que puede obtenerse por cualquier otro método de secado.

Un factor prominente es la rigidez estructural proporcionada por la congelación de la sustancia en la superficie en donde ocurre la sublimación. Esta rigidez en gran medida previene el colapso de la matriz sólida restante después del secado.

El secado en frío de alimentos y materiales biológicos también tiene la ventaja de pocas pérdidas de sabor y aroma.

Las bajas temperaturas de procesamiento, la ausencia relativa de agua líquida y la rápida transición de una parte del material que se seca de un completamente hidratado a un casi completamente estado de deshidratación, minimiza las reacciones degradativas que normalmente ocurren en los procesos de secado ordinario (Mujumdar, 2007).

3.7.1.1 Etapas de la liofilización

La liofilización involucra varias etapas:

- a) Congelación.
- b) Secado por sublimación del hielo (o del solvente congelado) del producto congelado, a muy baja presión.
- c) Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

En la liofilización el material original está construido por un núcleo central de material congelado. A medida que el hielo se sublima, el plano de sublimación, que se inicia en la superficie exterior, penetra al interior dejando atrás una superficie porosa de material ya seco.

El calor latente de sublimación del hielo, equivalente a 2838 kJ/kg, procede por conducción a través de la corteza de material seco. El agua congelada se sublima a presiones y temperaturas bajas. Por consiguiente, la transferencia de calor y masa se verifican simultáneamente.

3.7.1.2 Ventajas y Desventajas de la liofilización

La principal ventaja de esta técnica es la calidad superior del producto final. Sin embargo, visto el costo del proceso, la liofilización queda generalmente reservada para productos con un alto valor agregado, semejantes a los productos farmacéuticos o alimentos para bebés y ciertas especies. Una de las causas de este elevado costo es la longevidad del producto procesado en efecto, la baja presión del proceso y la débil conductividad de los productos liofilizados (debido a la textura porosa) afectan de manera significativa y negativa la transferencia de calor y de

masa y por consecuencia la duración de la operación de deshidratación. La tabla 3.4 muestra las diferencias entre el secado convencional y la liofilización.

Existen equipos de liofilización que están diseñados para remover una cantidad más amplia de sustancias tales como solventes orgánicos, los cuales tienen una temperatura muy baja de congelación, por lo tanto, las temperaturas de trabajo son temperaturas criogénicas por debajo de los 100 grados Celsius. Sin embargo, para este trabajo se cuenta con un Labconco Freezone el cual está diseñado para operar a presiones muy bajas (0.100 a 0.050 mbar) con un condensador que opera a -50 °C, por lo que está diseñado para soluciones acuosas sin solventes orgánicos.

Tabla 3.4 Diferencia entre secado convencional y liofilización.

SECADO CONVENCIONAL	LIOFILIZACIÓN
-Recomendada para obtener alimentos secos (verduras y granos).	-Recomendado para la mayoría de los alimentos, pero se han limitado a aquellos que son difícil de secar a través de otros métodos.
-Es poco satisfactorio para carne.	-Recomendado para carnes crudas y cocidas.
-Rango de T° 37-93 °C.	-Temperaturas debajo del punto de congelación.
-Presiones Atmosféricas	-Presiones reducidas (27-133 Pa).
-Se evapora el agua de la superficie del alimento.	-Se sublima el agua del frente de congelación.
-Existe movimientos amplios de solutos, esto causa endurecimiento.	-Movimiento mínimo de soluto.
-Las tenciones en alimentos sólidos causan daños estructural y encogimiento	-Cambios estructurales o encogimiento mínimo.
-Rehidratación incompleta o retardada.	-Rehidratación completa y rápida.
-Partículas porosas secas tienen a menudo una densidad más alta que el alimento original.	-Partículas porosas secas tienen una densidad más baja que la del alimento original.
-Olor y sabor frecuentemente anormal.	-Olor y sabor normalmente intensificado.
-Color más oscuro.	-Color normal.
-Valor nutritivo reducido.	-Nutrientes retenidos en gran porcentaje.
-Costos bajos.	-Costos generalmente altos.

3.7.2 Concentración por horno convectivo

Éste es un tipo de secado convectivo que involucra una previa concentración, siendo éste el más habitual. Es un equipo totalmente cerrado y aislado en el cual los sólidos se colocan en grupos de bandejas. La transmisión de calor puede ser directa del gas a los sólidos, utilizando los grandes volúmenes de gas caliente, o indirectas, usando repisas, serpentines de calefacción o paredes refractarias en el interior de la cubierta (Cabezas, 2008).

Los secadores de bandeja son los más antiguos y aún los más utilizados. Las bandejas pueden ser de fondo liso o enrejado. Una de las ventajas de este equipo es la habilidad de manejar un amplio rango de producto que varían en composición, forma y tamaño, lo cual lo convierte en una opción viable cuando se quiere elegir el tipo de secado, sin embargo, un mal diseño del equipo o del proceso provocaría mayores pérdidas de energía lo cual puede afectar la rentabilidad del proceso (Mujumdar, 2007).

Estos equipos tienen dos variaciones, una de secado directo en el cual el aire caliente es forzado a circular por las bandejas y la otra de secado indirecto, donde se utiliza el aire caliente proveniente de una fuente de calor radiante dentro de la cámara de secado y una fuente de vacío o un gas circulante para que elimine la humedad del secador (Cabezas, 2008).

En el secador la temperatura y el flujo deben ser muy uniformes. En general la velocidad del flujo recomendada para 100 kg del material es de 200 pies/min (Cabezas, 2008). La fuente energética de estos secadores puede ser de: vapor, electricidad, o hidrocarburos como carbón, petróleo, aceite y gas. Estos dos últimos calientan mucho más y son de bajo costo de funcionamiento, pero tienen el inconveniente de contaminar el producto y producir explosiones (Cabezas, 2008).

3.7.3 Concentración por evaporación y secado al vacío

La tecnología de secado al vacío es un proceso importante para el secado de materiales sensitivos que son ampliamente utilizados en industrias farmacéuticas y químicas, así como en productos alimenticios y biotecnología. El proceso de secado al vacío puede ser considerado de acuerdo a las condiciones físicas, para añadir calor y remover vapor de agua. La evaporación de agua procede más rápido a bajas presiones. Bajas temperaturas pueden ser usadas en vacío para ciertos materiales que se pueden decolorar o descomponer.

Uno de los métodos más usado es el secado al vacío por microondas, ya que este secado ofrece una alternativa atractiva y rentable comparada a la liofilización, en la producción de alta calidad de productos termosensibles. Kudra y Mujumdar (2002)

Estudios demuestran que los resultados de secado al vacío en microondas y liofilización son similares, no hay mucha diferencia entre ellos.

El secado al vacío en microondas ofrece las ventajas del calentamiento dieléctrico, pero una temperatura de procesamiento reducida, siendo la presión la función de operación. Además, un mecanismo de transferencia de calor volumétrico acoplado con el secado en ausencia de oxígeno (vacío), proporciona una técnica de secado ideal a baja temperatura. Kudra y Mujumdar (2002)

Este método parece ser un método bastante prometedor en la tecnología de secado, cuando se trata de conservar las propiedades del producto sometido a secado; sin embargo, no contamos con tal tecnología, por lo que se busca otra alternativa que sea similar, en este caso el rotavapor, ya que funciona al vacío y con temperaturas no muy elevadas.

3.7.3.1 Concentración al vacío con rotavapor

El rotavapor es un equipo donde se da una concentración del líquido por lo general a presiones bajas, pero el principio básico es regular la temperatura y presión, esto depende del objetivo en el proceso. Las condiciones de trabajo que se utilizan son presiones bajas y temperaturas bajas con el fin de proteger algunas sustancias termosensibles y, por lo tanto, utiliza un principio similar al de los secadores al vacío industriales.

Este sistema presenta la ventaja de que la evaporación del agua es más fácil con presiones bajas. En los secadores al vacío, la transferencia de calor se realiza por radiación y conducción y pueden funcionar por partidas o mediante banda continua con esclusas de vacío en la entrada y salida (Cabezas, 2008).

3.7.3.2 Ventajas del secado al vacío

- El secado al vacío es ideal para materiales que pueden ser dañados al ser expuestos a altas temperaturas.
- El vacío remueve humedad mientras previene oxidación y explosiones que pueden ocurrir cuando ciertos materiales se combinan con aire.
- El secado al vacío es también ideal en situaciones donde un solvente debe de ser recuperado o donde algunos materiales tienen que secarse hasta niveles muy bajos de humedad.
- A diferencia del secado a presión atmosférica, el secado bajo presiones menores, baja el punto de ebullición y provee una mayor diferencia de temperatura entre el medio calefactor y el producto. Esto provoca un secado y una recuperación más rápida del calor.

3.7.3.3 Desventajas del secado al vacío

- El secado al vacío consume más energía que el secado convencional.
- Requiere de equipos y condiciones más especializados que en el secado a presión atmosférica.

IV HIPÓTESIS Y VARIABLES

Hipótesis nula 1

H₀₁: Ninguno de los métodos de concentración y secado en estudio causa una disminución significativa del contenido de vitamina C con respecto al contenido inicial presente en el extracto (lixiviado). $VC_1 = VC_2 = VC_3 = VC_{\text{extracto}}$

Hipótesis alternativa 1

H_{a1}: Al menos uno de los métodos de concentración y secado afecta de manera significativa el contenido de vitamina C.

$$VC_1 \neq VC_{\text{extracto}} \text{ o } VC_2 \neq VC_{\text{extracto}} \text{ o } VC_3 \neq VC_{\text{extracto}}$$

Hipótesis nula 2

H₀₂: No existe una diferencia significativa en la eficiencia antioxidante del extracto luego de ser sometido a cada método de concentración y secado. $EA_1 = EA_2 = EA_3 = EA_{\text{extracto}}$

Hipótesis alternativa 2

H_{a2}: Al menos uno de los métodos de concentración y secado afecta de manera significativa la eficiencia antioxidante con respecto al lixiviado inicial.

$$EA_1 \neq EA_{\text{extracto}} \text{ o } EA_2 \neq EA_{\text{extracto}} \text{ o } EA_3 \neq EA_{\text{extracto}}.$$

Hipótesis nula 3

H₀₃: La constante cinética de velocidad del extracto de *Moringa* está en el rango de las constantes cinéticas de antioxidantes comunes (Vitamina E, BHA, BHT).

$$H_{o3} : k_{2,BHT} \leq k_{2,moringa} \leq k_{2,VitE}$$

Hipótesis alternativa 3

H_{a3}: La constante cinética de velocidad del extracto de *Moringa* es inferior que las constantes cinéticas de antioxidantes comunes (Vitamina E, BHA, BHT).

$$H_{a3} : k_{2,moringa} \leq k_{2,BHT}, k_{2,BHA}, k_{2,VitE}$$

V DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Material

En este trabajo se consideró estudiar las hojas de *Moringa* (*Moringa oleifera*), porque investigaciones previas han evidenciado que este vegetal posee grandes cualidades nutritivas (vitaminas, proteínas, ácidos grasos, y otros compuestos esenciales) y compuestos con propiedades antioxidantes y alto valor nutricional que lo convierte en buen candidato para estudiar cómo distintos métodos de concentración y secado (con diferencias en un amplio rango de temperatura y presión) afectan a estas propiedades.

5.1.1 Preparación del material vegetal (*Moringa oleifera*)

Las hojas frescas fueron recolectadas en el mes de marzo del año 2017, de árboles con aproximadamente 3 metros de altura, ubicados en la Universidad Nacional de Ingeniería, ciudad de Managua. Las hojas se lavaron con agua para eliminar cualquier tipo de partículas ajenas a la hoja, posteriormente éstas se pesaron y se llevaron a la maceración, usando etanol solvente al 35% v/v, con una proporción masa-volumen de hojas/solvente de 1:10.

5.2 Etapas del proceso

En la figura 5.1 se muestran las etapas del proceso y análisis que se llevaron a cabo para obtener el extracto.

La metodología consistió en una etapa inicial en la que se procesó el material vegetal para obtener los extractos. Esta etapa involucró la lixiviación, destilación del etanol, concentración con horno convectivo y rotavapor, y secado por liofilización.

5.2.1 Separación Extracto-Solvente

El etanol contenido en la disolución extracto-solvente, se separó por medio de destilación a una presión absoluta de 140 mmHg, y una temperatura de 40 °C, se tomó esta temperatura para evitar pérdidas de las propiedades antioxidantes y su calidad nutricional.

Finalizado este proceso, se obtuvo una disolución extracto-agua, la cual se llevó a una primera fase de concentración, hasta obtener un sólido húmedo y posteriormente a una segunda fase de secado, mediante los tres métodos antes mencionados. Esta etapa de separación se llevó a cabo por motivos técnicos, ya que el equipo donde se realizó la liofilización no permite la sublimación de solventes orgánicos como el etanol y es necesario que las muestras lleven el mismo proceso, lo cual permitió medir la degradación por igual.

5.2.2 Concentración y secado por rotavapor

Este proceso se realizó a condiciones de temperatura y presión de 100 °C, y 1000 mbar en un rotavapor *Büchi R-124*, el cual cuenta con un baño térmico *Fisher Scientific ISOTEMP 1016S*, una bomba de vacío *Büchi V-500* para regular la presión del sistema y una trampa de vapor. El principio básico de funcionamiento de este equipo, consiste en la separación de una sustancia líquida de una mezcla por diferencia de puntos de ebullición, variando temperatura y presión.

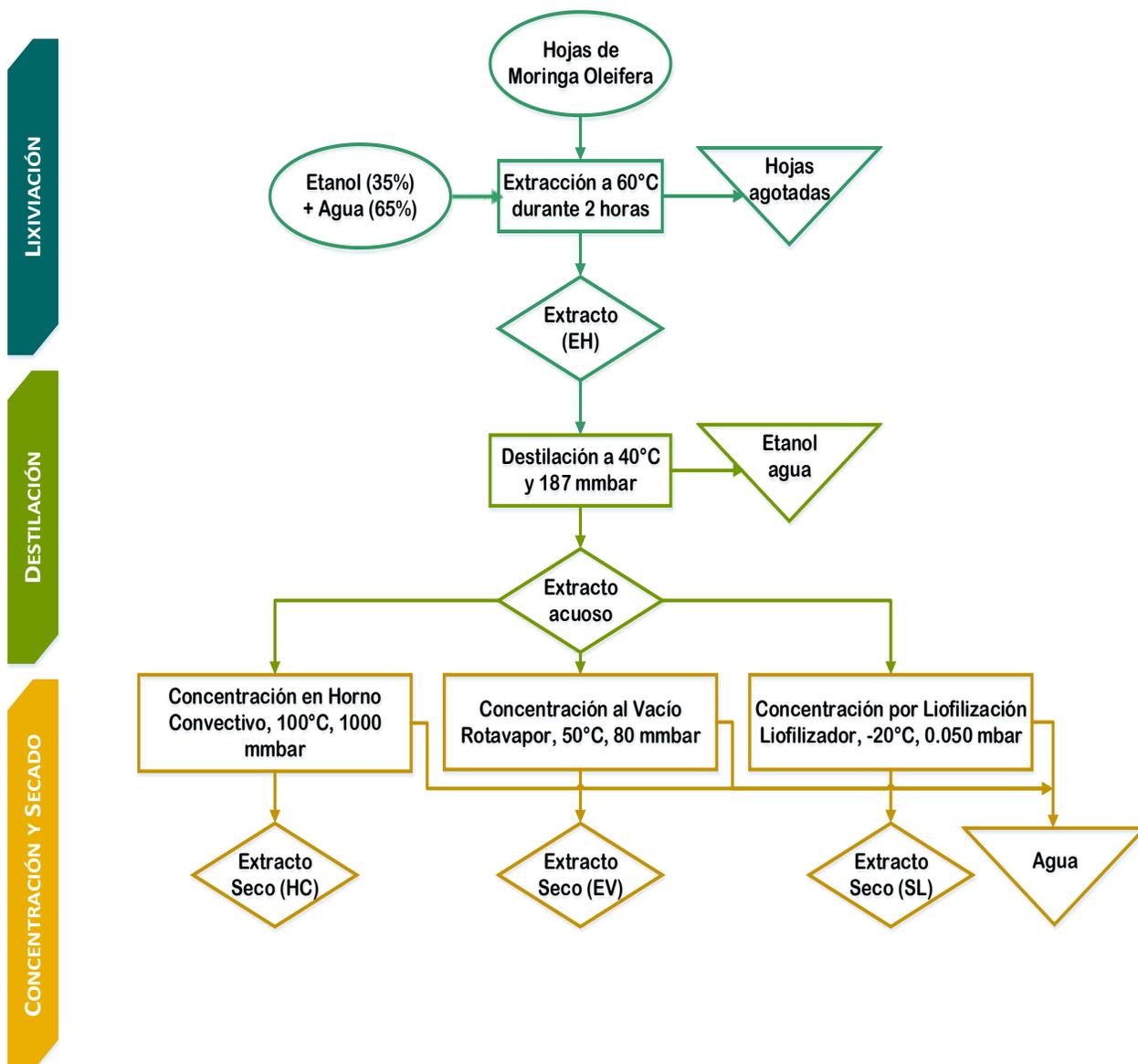


Figura 5.1 Diagrama de las etapas del proceso.

5.2.3 Secado por Liofilización

Este secado se realizó en un Liofilizador *Labconco Freezone* de 12 L, en el cual se conectó la muestra congelada con el equipo para someterla a condiciones de presión muy bajas (0.100 a 0.050 mbar) y separar el agua por sublimación.

En un recipiente de 600 ml especialmente diseñado para adaptarse a las condiciones del liofilizador, se agregaron 300 ml de la disolución resultante del proceso anterior para llevarlo a una temperatura menor a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, este proceso se realizó en 12 horas.

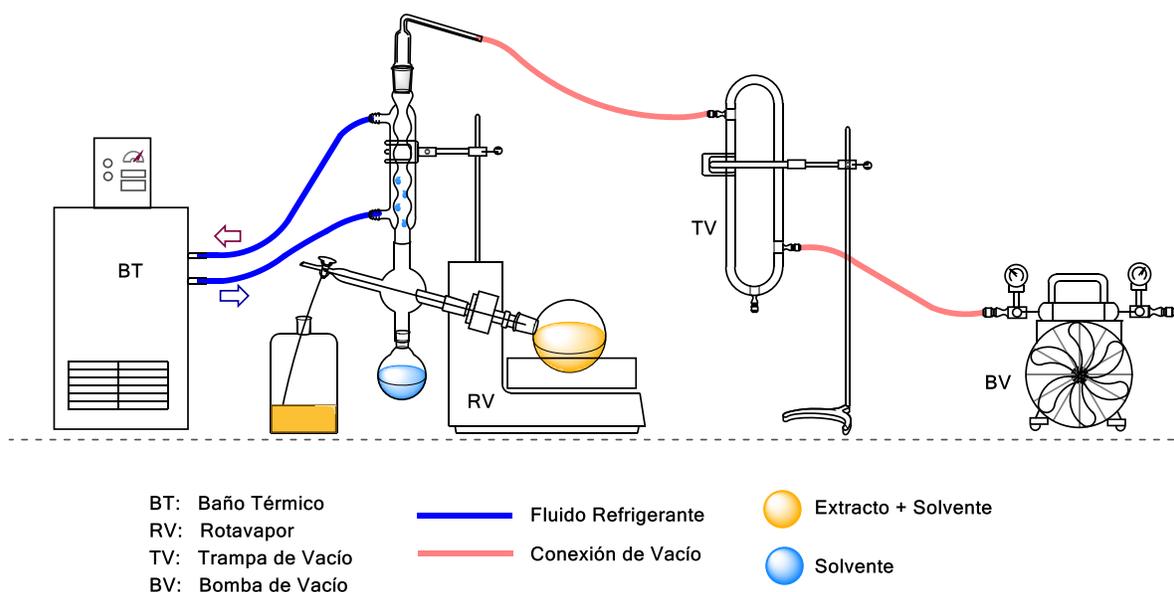


Figura 5.2 Esquema del montaje del sistema para secado del extracto al vacío usando un evaporador rotatorio.

Luego se colocó el recipiente en el liofilizador por 36 horas a una presión de 0.050 mbar y una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lograr separar el agua del extracto. Después de finalizado este tiempo se obtuvo el extracto sólido. Se calculó la concentración de éste tomando en cuenta el peso inicial menos el peso final y luego, el extracto fue sometido a pruebas posteriormente descritas.



Figura 5.3 Modelo del liofilizador que se utilizó para el secado por sublimación.

5.2.4 Concentración y secado en horno convectivo

Para el secado convectivo, se utilizó un Horno *Fisher Scientific 825 F* con rango de 40 a 325 °C ± 2 °C de uniformidad, éste se realiza aprovechando un flujo de aire convectivo a presión atmosférica.

En un beaker de 500 ml, se depositó 300 ml de la solución que resultó del proceso separación extracto-solvente (al igual que los otros dos métodos de concentración y secado) para posteriormente someterlo a una temperatura de 100 grados Celsius en horno, el cual trabaja a condiciones normales de presión (1 atm). El sistema se dejó dentro del horno durante 8 horas, hasta que el agua se evaporó en su totalidad.

5.3 Determinación y análisis efectuados

Se realizaron distintos ensayos experimentales para calcular la eficiencia antioxidante, que involucró determinar parámetros de la cinética de inhibición del radical DPPH; realizar un estudio cinético para encontrar el comportamiento de inhibición mediante el cálculo de la constante cinética de reacción empleando modelos descritos en la sección 5.4 y cuantificar el contenido de vitamina C luego del proceso de concentración y secado. Estos análisis se detallan en la sección 5.3, 5.4 y 5.5.

Las pruebas se realizaron por triplicado para reportar la media y desviación estándar en los resultados y se utilizó como software de procesamiento estadístico el programa SPSS v18 para hacer el análisis de varianza (ANOVA) con un valor de significancia: $p=0.05$ y probar las hipótesis.

Se realizaron pruebas Post Hoc para determinar si existía diferencia significativa entre los distintos métodos de concentración y secado tanto para la eficiencia antioxidante como la vitamina C.

En la figura 5.4 se muestra los análisis y los pasos para la determinación de parámetros.

5.4 Determinación de vitamina C

Este ensayo se realizó con el sistema Konik HPLC 560, con columna XDB C-8 SGE 250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula 5 μm , haciendo uso del software Konikrom plus. El cual consiste en una cromatografía de partición en fase reversa y fase móvil polar con la detección en el campo ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

5.4.1 Fase móvil y curva de calibración

Antes de hacer las lecturas de vitamina C en el HPLC, se preparó la fase móvil de acuerdo a las especificaciones técnicas de la columna que se utilizó y posteriormente se realizó la curva de calibración para calcular los valores de las concentraciones de las muestras desconocidas.

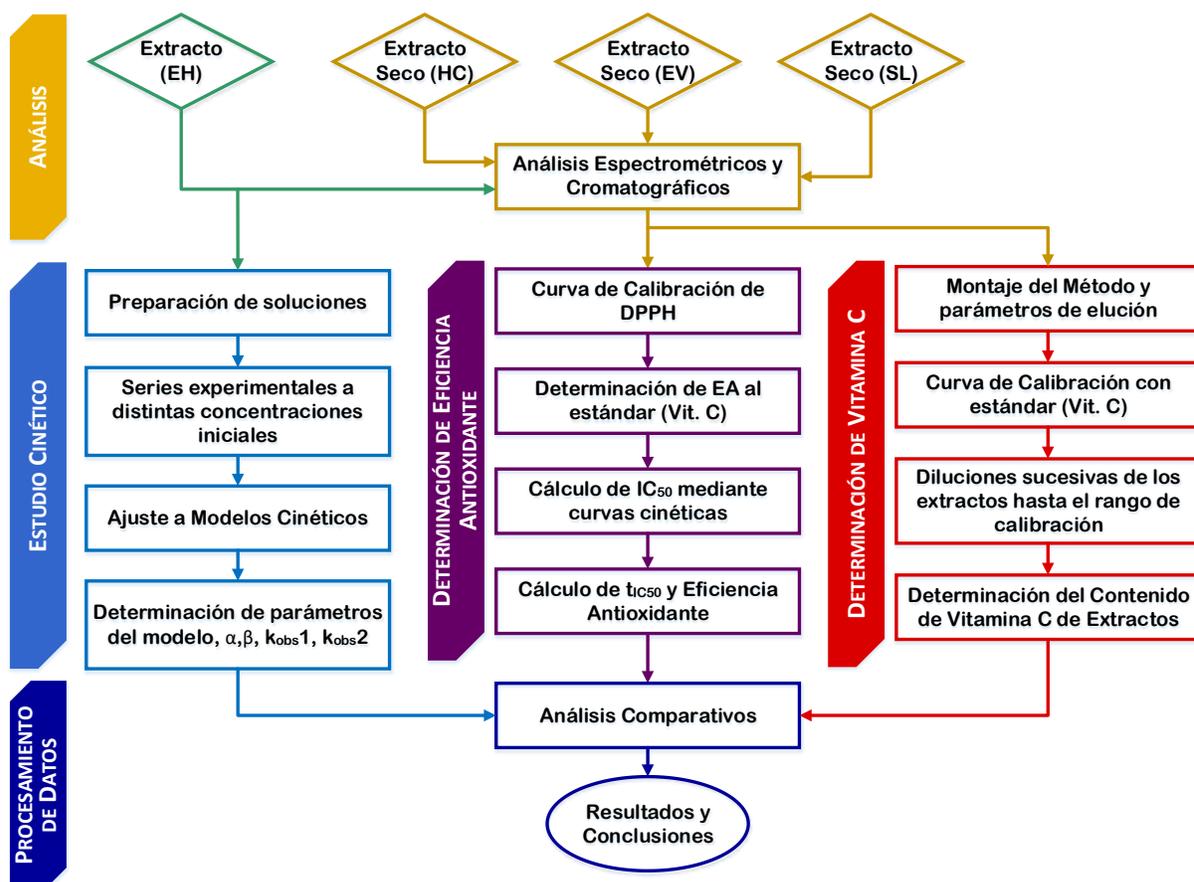


Figura 5.4 Diagrama de análisis y determinación de parámetros.

5.4.2 Determinación del contenido de vitamina C de extractos

5.4.2.1 Cuantificación de vitamina C en el extracto antes del secado (Lixiviado)

Para este análisis se tomaron 2.5 g del extracto y se diluyó con 10 ml de agua desionizada. Luego se tomó 1 ml de la solución y se llevó a 100 ml usando agua destilada, posteriormente se filtró con acrodiscos de membrana de poro 0.22 μm . Esto necesario para eliminar algunas partículas no deseadas en el sistema.

A continuación, se tomaron 100 microlitros, con una jeringa especializada para su posterior inyección. A este análisis se le realizaron dos replicas tomando en cuenta los mismos procedimientos.

5.4.2.2 Cuantificación de vitamina C en el extracto concentrado mediante horno convectivo

Para este análisis se tomaron 2.5 g del extracto seco y se diluyó con 10 ml de agua destilada, posteriormente se tomó 1 ml esta solución y se llevó a 100 ml usando agua destilada, posteriormente se filtró con acrodiscos de membrana de poro 0.22 μm .

Luego, se tomaron 100 microlitros, con una jeringa especializada para su posterior inyección. A este análisis se le realizaron dos replicas tomando en cuenta los mismos procedimientos.

5.4.2.3 Cuantificación de vitamina C en el extracto concentrado al vacío en rotavapor

Este análisis se realizó de la misma manera que los anteriores, tomando 2.5 g del extracto seco y se llevaron a los 10 ml con agua destilada, luego se tomó 1 ml de la solución y se llevó a 100 ml usando agua destilada, posteriormente se filtró con acrodiscos de membrana de poro 0.22 μm y se tomaron 100 microlitros, con una jeringa especializada para su posterior inyección. A este análisis se le hizo dos réplicas tomando en cuenta los mismos procedimientos.

5.4.2.4 Cuantificación de vitamina C en el extracto secado por liofilización

Al igual que en la determinación de la vitamina C con los extractos anteriores, se realizaron para este extracto, tomando los 2.5 g de extracto seco y se llevaron a 10 ml con agua destilada y se tomó 1 ml de la solución para llevarlo a 100 ml usando agua destilada, posteriormente se filtró con acrodiscos de membrana de poro 0.22 μm . Luego se tomaron 100 microlitros, con una jeringa especializada para su posterior inyección. A este análisis se le hicieron dos réplicas tomando en cuenta los mismos procedimientos.

A partir de los valores de vitamina C obtenidos en los análisis, se calculó la pérdida de vitamina C en los extractos que han pasado por un previo concentrado o secado tomando en cuenta como punto de referencia la vitamina C que contenga el extracto de la prueba inicial. Por otra parte, se hicieron los respectivos cálculos para saber si existe o no diferencia significativa en los métodos de secado.

5.5 Análisis de la Eficiencia Antioxidante

Para la determinación de la eficiencia antioxidante se usó un espectrofotómetro Uvikon 810 Kontron, con cubetas desechables (1 cm x 1 cm x 4.5 cm). En la sección de Anexos, se adjuntan fotos de los principales equipos mencionados en esta sección que se utilizaron en el desarrollo experimental.

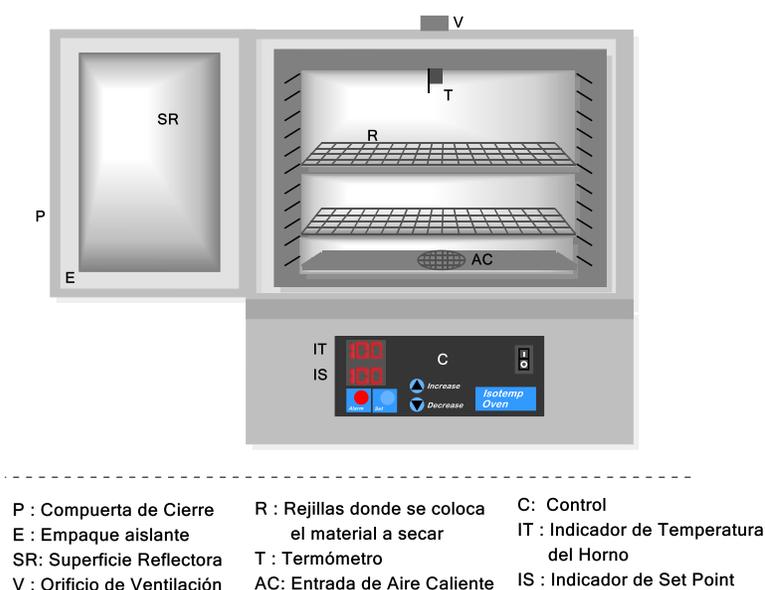


Figura 5.5 Diagrama del Horno donde se realizó el secado convectivo.

Para analizar la actividad antioxidante, se realizó el ensayo de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) para estudiar el comportamiento cinético de la eliminación de radicales libres del extracto de *Moringa* y seleccionar parámetros útiles para determinar la eficiencia antioxidante, usando el método planteado por (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998). Este análisis se realizó para los extractos concentrados y secados mediante los tres métodos antes mencionados, también se realizó para el extracto inicial (previo al secado), y ácido ascórbico, de esta manera se obtuvieron datos los cuales nos sirvieron para realizar una comparación y analizar la eficiencia antioxidante que el extracto contiene.

5.5.1 Eficiencia antioxidante del ácido ascórbico

La eficiencia antioxidante de los extractos de *Moringa* se comparó con un antioxidante de referencia, en este caso se realizó con la vitamina C, y como solvente se utilizó etanol grado analítico.

En esta sección se describen los pasos a seguir para llevar a cabo esta prueba.

- Se preparó una solución de DPPH a 0.0250 g L^{-1} pesando 0.0025 g de DPPH y disolviéndolos en 100 ml de solvente.
- Se prepararon 6 soluciones madre con una concentración de $50, 100, 150, 170, 175$ y 200 g de Vitamina C por cada kg de DPPH, las cuales se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Soluciones preparadas para el análisis de eficiencia antioxidante.

Soluciones madres	g de vit C aforados a 100 mL	g de vit C/ Kg DPPH
1	0.00125	50
2	0.00250	100
3	0.00375	150
4	0.00425	170
5	0.00437	175
6	0.00500	200

Se probó 0.1 ml de cada solución conteniendo vitamina C en 10 ml de solución de DPPH, y se midió la absorbancia en un intervalo de tiempo de dos minutos hasta lograr que alcanzara un estado estable, para posteriormente graficar el porcentaje de DPPH remanente contra el tiempo de reacción y encontrar la concentración correspondiente a EC_{50} y el tiempo en que dicha reacción alcanza estabilidad (t_{EC50}), esto con el propósito de calcular el nuevo parámetro de eficiencia anti radical EA, con la ecuación 3.2.

5.5.2 Eficiencia antioxidante del extracto de las hojas de *Moringa* antes del de la concentración y secado

El análisis de la eficiencia antioxidante de este extracto inicial se hizo con el fin de comparar las pérdidas de los compuestos antioxidantes del extracto después de cada uno de los distintos métodos de secado.

Para esta prueba se utilizó una solución de 0.0025 g de DPPH en 100 ml de alcohol etílico grado analítico, y se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de extracto, a las cuales se le realizaron dos replicas.

A continuación, se detallarán las concentraciones del extracto utilizadas partiendo de una concentración de 10.4 mg/ml:

- Se tomaron 10 ml de la solución de DPPH y 0.45 ml de los extractos a las concentraciones de 10.4 mg/ml, 2 mg/ml, 1.6 mg/ml y 1.5 mg/ml.
- Se realizaron dos réplicas del paso anterior para obtener tres resultados para una misma concentración.

A partir de los datos obtenidos, se graficó el porcentaje de DPPH remanente contra el tiempo y se determinó la dosis óptima (EC_{50}), que es la cantidad de antioxidante para disminuir la concentración de DPPH inicial en un 50% y el tiempo de estabilidad (t_{EC50}), por lo que se dejó el tiempo que sea necesario, hasta observar que la absorbancia sea constante, y se procedió a calcular la Eficiencia antioxidante, también se realizó una comparación de la EA del extracto de las hojas de *Moringa* en relación a la EA ácido ascórbico.

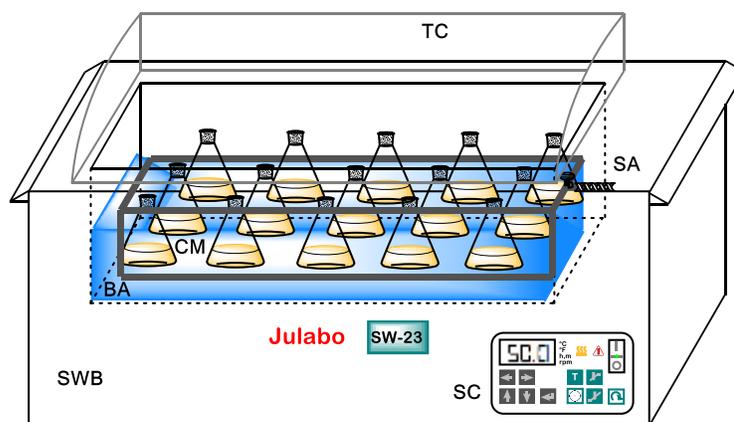
5.5.3 Lixiviación

La primera parte experimental consistió en la obtención del extracto, usando una solución acuosa de etanol al 35% volumen/volumen. Éste fue utilizado, debido a que en la literatura se encontró que Nazar *et al.* (2015) usó agua, etanol, metanol y éter de petróleo como solventes, para obtener el extracto desde las hojas de *Moringa*, siendo el etanol el más efectivo.

Se tomaron dos muestras de 100 g de hojas frescas de *Moringa* y 1000 ml de la solución acuosa de etanol, los cuales se depositaron en dos frascos de 1400 ml. Dichas muestras fueron sometidas a un baño térmico durante 2 horas a 120 rpm y temperatura de 50°C.

Estos parámetros se usaron debido a que (Valdés-Hernández *et al.*, 2015) realizó un estudio para determinar el tiempo de extracción, y se encontró que el tiempo óptimo es de 3 horas, y no hubo mucha diferencia en relación a 2 horas, con esa misma temperatura. Esto se realizó en un Shaking Water Bath, *JULABO SW23* con capacidad de temperatura de 20 a 99 °C y una frecuencia ajustable de 20 a 200 rpm, cuya función es mantener a una cierta temperatura y constante movimiento, para facilitar la extracción, el cual se representa en la figura 5.6

Una vez finalizada la extracción, se filtró la solución extracto-solvente y se desechó el material vegetal sólido agotado.



- | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| SWB: Shaking Water Bath | BA : Baño de Agua | ● Extracto + Solvente |
| SA : Sistema de Agitación | TC : Tapa de Cierre | ● Agua de Calentamiento |
| CM: Canasta Metálica | SC : Sistema de Control | |

Figura 5.6 Diagrama del Baño de Agua con Agitación y Calentamiento que se usará para la extracción de las hojas de *Moringa* con 35% etanol y 65% de agua.

5.5.4 Concentración al vacío en rotavapor

En esta parte del proceso se tomó la misma cantidad usada en la liofilización, por lo que en un balón pera de 1000 ml se depositó 300 ml de la disolución extracto-agua resultante del proceso separación extracto-solvente, este recipiente se sometió a un baño térmico a una temperatura de 50 °C y presión de 60 mmHg (80 mbar) en un rotavapor *Büchi R-124* (mismo usado en el proceso de separación extracto-solvente), hasta lograr eliminar por completo la humedad, y de la misma manera que el extracto liofilizado se calculó la concentración.

5.5.5 Eficiencia antioxidante del extracto concentrado en horno convectivo

Para realizar este análisis se determinó la concentración del extracto en la solución, y a partir de dicha concentración, se prepararon cuatro soluciones con diferentes concentraciones al igual que se llevó a cabo en el análisis de la EA de la prueba inicial.

Se utilizó una solución de 0.0025 g de DPPH en 100 ml de alcohol etílico grado analítico, y se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de extracto.

Las concentraciones que se utilizaron fueron cuatro a las cuales se le realizaron dos réplicas:

- Se tomaron 10 mL de la solución de DPPH y 0.45 ml de los extractos a las concentraciones de 10 mg/mL, 6 mg/mL, 4 mg/mL y 2 mg/mL.

Con los datos obtenidos, se graficó el porcentaje de DPPH remanente contra el tiempo y se determinó la dosis óptima (EC_{50}) y el tiempo de estabilidad (t_{EC50}), y se calculó la Eficiencia antioxidante, también se realizó una comparación de la EA de este extracto en relación a la EA ácido ascórbico y a la EA del extracto inicial (antes del secado). También se calculó en términos de porcentajes la capacidad antioxidante perdida durante este secado.

5.5.6 Eficiencia antioxidante del extracto secado por liofilización

En este análisis se determinó la concentración del extracto en la solución, y a partir de dicha concentración, se prepararon cuatro soluciones con diferentes concentraciones.

Al igual que en la determinación de la eficiencia antioxidante del extracto anterior, se usó la misma solución de DPPH la cual equivale a 0.0025g en 100 ml de alcohol etílico grado analítico, y se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de extracto, a las cuales se le realizaron dos réplicas. Las concentraciones fueron las siguientes:

- Se tomaron 10 mL de la solución de DPPH y 0.45 ml de los extractos a las concentraciones de 10 mg/mL, 1.9 mg/mL, 1.5 mg/mL y 1.3 mg/mL.

A partir de los datos obtenidos se graficó el porcentaje de DPPH remanente contra el tiempo y se determinó la dosis óptima (EC_{50}) y el tiempo de estabilidad (t_{EC50}), y se encontró la Eficiencia Antioxidante, también se realizó una comparación de la EA del extracto secado mediante liofilización en relación a la EA ácido ascórbico y a la EA del extracto inicial. También se calculó en términos de porcentajes la capacidad antioxidante perdida durante este secado.

5.5.7 Eficiencia Antioxidante del extracto concentrado al vacío en rotavapor

El procedimiento que se llevó a cabo es similar a los anteriores, iniciando por determinar la concentración del extracto en la solución, se prepararon cuatro soluciones con diferentes concentraciones.

Se utilizó una solución de 0.0025 g de DPPH en 100 ml de alcohol etílico grado analítico, y se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de extracto, a las cuales se le realizaron dos réplicas. Las concentraciones fueron las siguientes:

- Se tomaron 10 mL de la solución de DPPH y 0.45 ml de los extractos a las concentraciones de 3 mg/mL, 2.1 mg/mL, 1.9 mg/mL y 1.7 mg/mL.

A partir de los datos obtenidos se graficó el porcentaje de DPPH remanente contra el tiempo y se determinó la dosis óptima (EC_{50}) y el tiempo de estabilidad (t_{EC50}), y se encontró la Eficiencia antioxidante, también se realizó una comparación de la EA del extracto de las hojas de *Moringa* en relación a la EA ácido ascórbico y a la EA del extracto inicial. También se calculó en términos de porcentajes la capacidad antioxidante perdida durante este secado.

5.6 Cinética de degradación de DPPH por extracto de hojas de *Moringa oleifera*

El estudio cinético se realizó para observar el comportamiento de la reacción que se da entre el extracto de las hojas de *Moringa* frente al DPPH, y determinar la velocidad con que éstos reaccionan. En este análisis se consideró la constante de reacción de segundo orden ya que se han hecho estudios previos que han demostrado que la ley de velocidad para la reacción que se da entre un antioxidante frente al DPPH siguen la cinética de reacción de segundo orden a una temperatura dada Leal-Alturo (2012).

5.6.1 Preparación de las concentraciones

Al preparar las concentraciones se usó etanol grado analítico al 96% para las diluciones, se preparó una concentración de DPPH y cinco diferentes concentraciones del extracto.

Se tomaron 2.5 mg de DPPH y se diluyó en 100 ml de etanol, para lograr una concentración de 0.25 mg/ml.

Las concentraciones del extracto fueron: $C_1= 0.2300$ mg/ml, $C_2=0.1370$ mg/ml, $C_3=0.0920$ mg/ml, $C_4=0.0462$ mg/ml, Cada una de estas concentraciones se hicieron reaccionar con la misma concentración de DPPH.

5.6.2 Series experimentales a distintas concentraciones

Las cuatro concentraciones de extracto se hicieron reaccionar frente a una misma concentración de DPPH, se observó la disminución de la concentración de DPPH midiendo la absorbancia durante 600 segundos a 517 nm, en intervalos de 30 segundos. Para cada concentración se realizaron dos réplicas.

5.6.3 Montajes del método y parámetros de elución.

Para realizar el análisis de la cuantificación de Vitamina C, era necesario que se cumpliesen con ciertas condiciones y parámetros, los cuales son:

Columna: XDB C-8

Flujo: 1ml/min

Detector: UV Visible 254 nm

Fase móvil: Metanol (50%), Agua desionizada (10%), ácido sulfúrico 0.05M (40%).

5.6.4 Determinación de los parámetros del modelo y constante cinética k_2

Para la determinación de los parámetros del modelo utilizado y la constante cinética se monitoreó la reacción entre la mezcla de antioxidantes y DPPH' de acuerdo a la siguiente reacción:



Según Leal. A *et al.* (2012). se ha demostrado que la ley de velocidad de reacción que se da entre antioxidantes frente al radical DPPH', siguen una cinética de segundo orden a una temperatura, de acuerdo a:

$$-\frac{d[\text{DPPH}']}{dt} = k_2 \cdot [\text{AH}']_0 \cdot [\text{DPPH}']_t \quad (5.2)$$

Donde k_2 corresponde a la constante de reacción, para una cinética de segundo orden, los términos $[\text{AH}]_0$ y $[\text{DPPH}']$ son las concentraciones de la mezcla de antioxidantes y DPPH respectivamente.

Se consideró que la concentración de antioxidantes permaneció constante con respecto al tiempo, es decir: $[\text{AH}]_0 \gg [\text{DPPH}']_0$, según los fundamentos de la cinética química podemos asumir que la reacción sigue una cinética de pseudo primer orden de acuerdo a la ley de velocidad de la ecuación 5.3.

$$-\frac{d[\text{DPPH}']_t}{dt} = k_{obs} \cdot [\text{DPPH}']_t \quad (5.3)$$

Donde k_{obs} corresponde a la constante de velocidad observada de pseudo primer orden para la reacción a una temperatura T. Desarrollando la ecuación 5.3 se llega:

$$\begin{aligned}
 d[DPPH^*]_t &= -k_{obs} \cdot [DPPH^*]_t dt \\
 \int \frac{d[DPPH^*]_t}{[DPPH^*]_t} &= -k_{obs} \int dt \\
 \ln[DPPH^*]_t &= \ln[DPPH^*]_0 - k_{obs}t \\
 [DPPH^*]_t &= [DPPH^*]_0 e^{-k_{obs}t}
 \end{aligned} \tag{5.4}$$

La ley de velocidad para la reacción general (5.2) es:

$$-\frac{d[DPPH]_t}{dt} = k_{obs} \cdot [DPPH]_t = k_2 \cdot [AH]_0 \cdot [DPPH]_t \tag{5.5}$$

Debido a que la reacción fue monitoreada en unidades de absorbancia, la ecuación que relaciona la concentración de DPPH' con la absorbancia es:

$$[DPPH^*] = x \cdot A \tag{5.6}$$

Donde x es una constante de proporcionalidad entre [DPPH'] y A. Sustituyendo en la ecuación (5.5) y dividiendo toda la igualdad entre la constante x resulta:

$$-\frac{dA}{dt} = k_{obs} \cdot A = k_2 \cdot [AH]_0 \cdot A \tag{5.7}$$

Se ajustó los datos obtenidos mediante el uso del programa MATLAB al modelo bi-exponencial (7.1), ya que Foti, M. *et al.* (2016) aplic un modelo bi exponencial para el ajuste de los datos entre obtenidos de la reacción entre DPPH' y curcumin.

$$A = \alpha \cdot e^{-k_{obs1}t} + \beta \cdot e^{-k_{obs2}t} + c \tag{5.8}$$

Donde t es el tiempo, A es la absorbancia en cualquier tiempo, k_{obs1} y k_{obs2} son constantes de velocidad observadas de pseudo primer orden, A_0 la absorbancia en tiempo cero, y $\alpha + \beta = A_0$. El cálculo de la k_2 se llevó a cabo a partir de la relación planteada en la ecuación (5.7).

5.7 Diseño experimental

Las hipótesis propuestas en la sección 4, cuyo fin es dar respuesta a los objetivos específicos fueron comprobadas mediante tres análisis estadísticos: los que corresponden al análisis del

contenido de vitamina C, la efectividad antioxidante y el estudio de la cinética de la reacción DPPH vs extracto.

5.7.1 Cuantificación de Vitamina C

Para el contenido de Vitamina C se implementó un diseño de un solo factor multinivel, donde el factor independiente es el método de concentración con 4 niveles: sin método de concentración (extracto), concentración en horno, concentración al vacío en rotavapor y secado por liofilización. Las variables de respuesta fueron la eficiencia antioxidante y cantidad de vitamina C, respectivamente.

Para comprobar las hipótesis planteadas de si al menos uno de los métodos causó una diferencia significativa (degradación) en el contenido de vitamina C respecto a los demás, se realizó un análisis de varianza, ANOVA, de la misma forma que se hizo para la eficiencia antioxidante.

Se realizó un análisis Descriptivo estadístico de los datos, prueba de normalidad para verificar que haya normalidad en los mismos y se llevó a cabo la prueba de Levene para comprobar que haya homogeneidad de varianzas en los tratamientos.

Posteriormente se llevó a cabo el ANOVA y mediante el valor p se pudo verificar si se acepta la hipótesis nula (no hubo diferencia significativa en el contenido de vitamina C luego de utilizar los 3 métodos de concentración y secado) o si se rechaza dicha hipótesis (al menos uno de los métodos de concentración y secado afectó de manera significativa el contenido de vitamina C).

Tabla 5.2 Diseño experimental para análisis de Vitamina C.

Factor	Niveles	Concentraciones g/mg	Número de ensayos por concentración	Número de experimentos por nivel
Método de concentración	Sin secado (Lixiviado)	C ₁	3	3
	Secado convectivo	C ₁	3	3
	Secado al vacío	C ₁	3	3
	Secado por liofilización	C ₁	3	3
Total de experimentos:				12

Se realizaron pruebas post hoc para determinar cuáles de los tratamientos tuvo una diferencia significativa en el contenido de vitamina C respecto a los demás y podremos inferir en cuál de los métodos de concentración degradó más a la vitamina C (que como se mencionó en el marco de referencia es un indicador del grado de degradación de los demás nutrientes) y cuál de los métodos causó menor degradación en esta vitamina.

De esta forma, analizando los resultados de estas pruebas de hipótesis, podremos recomendar el uso de alguno de los métodos de concentración cuando se vaya a procesar las hojas de *Moringa*, de manera que se conserven mejor tanto las propiedades antioxidantes como su valor nutricional y vitamínico.

5.7.2 Análisis de la efectividad antioxidante

Se tenía 1 factor, siendo éste el método de concentración y secado; 4 niveles, en donde cada nivel se llevó a cabo con 4 diferentes concentraciones, y se realizaron dos réplicas a cada uno; y la variable fue la Efectividad Antioxidante.

Para poder responder a la hipótesis planteada de si al menos uno de los métodos de concentración y secado tiene un efecto significativo en la eficiencia antioxidante, se realizó la prueba de ANOVA de un solo factor. Esta prueba asume que los datos tienen una distribución normal, que las muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes y que existe igualdad de varianzas.

Los datos fueron procesados usando el programa *PASW Statistics 18 – SPSS*. Para verificar que nuestro ANOVA es apropiado se verificó cada supuesto de la siguiente manera:

Tabla 5.3 Diseño experimental para análisis de efectividad antioxidante.

Factor	Niveles	Concentraciones mg/g DPPH	Número de ensayos por concentración	Número de experimentos por nivel
Método de concentración	Sin secado (Lixiviado)	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄	3	12
	Secado convectivo	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄	3	12
	Secado al vacío	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄	3	12
	Secado por liofilización	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄	3	12
Total de experimentos:				Total: 48

La normalidad de los datos se comprobó con Estadísticos Descriptivos y la Prueba de Normalidad. En todos los análisis de los experimentos se tomó un $\alpha = 0.05$, por lo que los intervalos de confianza se calcularon al 95%. Concluyendo según el valor de significancia dado en la prueba de normalidad, de tal manera que si el valor p fue mayor a 0.05, se aceptó la hipótesis nula (los datos se distribuyen normalmente). En caso contrario, si $p < 0.05$, la hipótesis nula se rechazó.

La hipótesis de la homogeneidad de las varianzas se realizó mediante la Prueba de Levene. Si la significancia de la prueba es mayor que 0.05, se considera que hay homogeneidad de varianzas. En caso contrario, las varianzas de las muestras de cada tratamiento se consideraron distintas, por lo que se tuvo que recurrir a una prueba ANOVA con varianzas desiguales.

Una vez comprobados los supuestos del ANOVA, se realizó la prueba considerando como variable dependiente las *Concentraciones* y variable independiente y agrupadora el *Método de concentración y secado*. Si la significancia de la tabla ANOVA obtenida es mayor que 0.05, se acepta la hipótesis nula de que no hubo diferencia significativa en la eficiencia antioxidante al usar los tres métodos de concentración y secado.

Si el valor p del ANOVA es menor que 0.05, entonces se rechaza la Hipótesis nula, de manera que la conclusión sea que si hubo una diferencia significativa en la eficiencia antioxidante con al menos uno de los tratamientos de concentración propuestos en este estudio.

De resultar correcto este supuesto, se lleva a cabo una prueba post hoc, que permite hacer una comparación entre las medias de los grupos (métodos de concentración) para determinar cuál o cuáles de los métodos son distintos entre sí, con el valor de significancia asumido ($\alpha = 0.05$).

De esta manera se puede inferir cuál de los métodos de concentración tuvo un mayor efecto sobre la reducción en la eficiencia antioxidante con respecto al extracto inicial y podremos concluir cuál de los métodos es más eficiente en conservar el poder de los antioxidantes contenidos en el extracto y cuál daña más estos compuestos.

5.7.3 Estudio de la cinética de la reacción

Para el estudio de la cinética, se realizó una serie de experimentos a distintas concentraciones del extracto sin concentrar, los datos obtenidos se ajustaron usando un modelo bi-exponencial para obtener los parámetros cinéticos. Posteriormente, las constantes de velocidad de pseudo-primer orden se graficaron vs la concentración y se ajustaron a un modelo lineal donde la pendiente es el valor k_2 , que es la constante de velocidad de la reacción.

Esta constante k_2 estimada se comparó con valores calculados a iguales condiciones para otros antioxidantes y otros extractos de plantas.

Tabla 5.4 Diseño Experimental para análisis cinético de la reacción de antioxidantes con el DPPH.

Nivel	Concentraciones mg/g DPPH	Número de ensayos por concentración	Número de experimentos por nivel
	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄	3	12
Total de experimentos:			Total: 12

VI ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1 Vitamina C

6.1.1 Análisis estadístico del contenido de vitamina C

El análisis estadístico para el contenido de vitamina C en el extracto después de su debido tratamiento, se llevó a cabo comprobando inicialmente la normalidad de cada grupo de datos, con el fin de conocer si estos datos se distribuyen normalmente, ya que es un criterio necesario para aplicar el ANOVA.

Tabla 6.1 Pruebas de normalidad para los datos obtenidos de vitamina C.

Método de secado	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Extracto de las hojas	0.206	3	.	0.993	3	0.836
Secado por Liofilización	0.383	3	.	0.754	3	0.009
Concentración al Vacío	0.344	3	.	0.842	3	0.219
Concentración por Horno	0.223	3	.	0.985	3	0.767

Las pruebas de normalidad para los valores de contenido de vitamina C, se muestra en la tabla 6.1, donde se puede ver los valores de significancia para cada tratamiento.

Para el extracto de hojas de *Moringa oleifera*, concentración del extracto por medio de vacío y concentración por horno, los valores de significancia son mayores a 0.05, llegando a la conclusión de que estos valores se distribuyen normalmente.

Sin embargo, los datos obtenidos del método de secado por liofilización no se distribuyen de una manera normal, ya que la significancia es de 0.009, y ésta es menor que 0.05.

Tabla 6.2 Prueba de homogeneidad de varianzas para los datos de vitamina C.

Vitamina C			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.560	3	8	0.067

La prueba de Levene, (Tabla 6.2) es un requisito para realizar el ANOVA, ya que se necesita saber si las varianzas son homogéneas o heterogéneas.

Según el valor de significancia proporcionado por la prueba, se puede suponer varianzas iguales entre cada grupo de datos, a pesar de que los datos obtenidos del secado por liofilización no muestran normalidad, al hacer el análisis general, se puede considerar igualdad de medias, en otras palabras, no hay diferencias significativas entre las varianzas de cada grupo de datos.

En la Figura 6.1, se muestran 4 gráficos Q-Q con los valores del contenido de vitamina C vs el correspondiente cuantil gaussiano. Se interpreta que los datos del extracto inicial, concentración por horno y concentración al vacío siguen una distribución normal ya que los puntos se encuentran cercanos a la recta de ajuste. En el caso del secado por liofilización, dos de los valores se ven alejados de la recta, corroborando con el valor de significancia mostrado en la tabla 6.1.

En la tabla 6.1 y 6.2 se muestra las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza, para poder aplicar el ANOVA correcto.

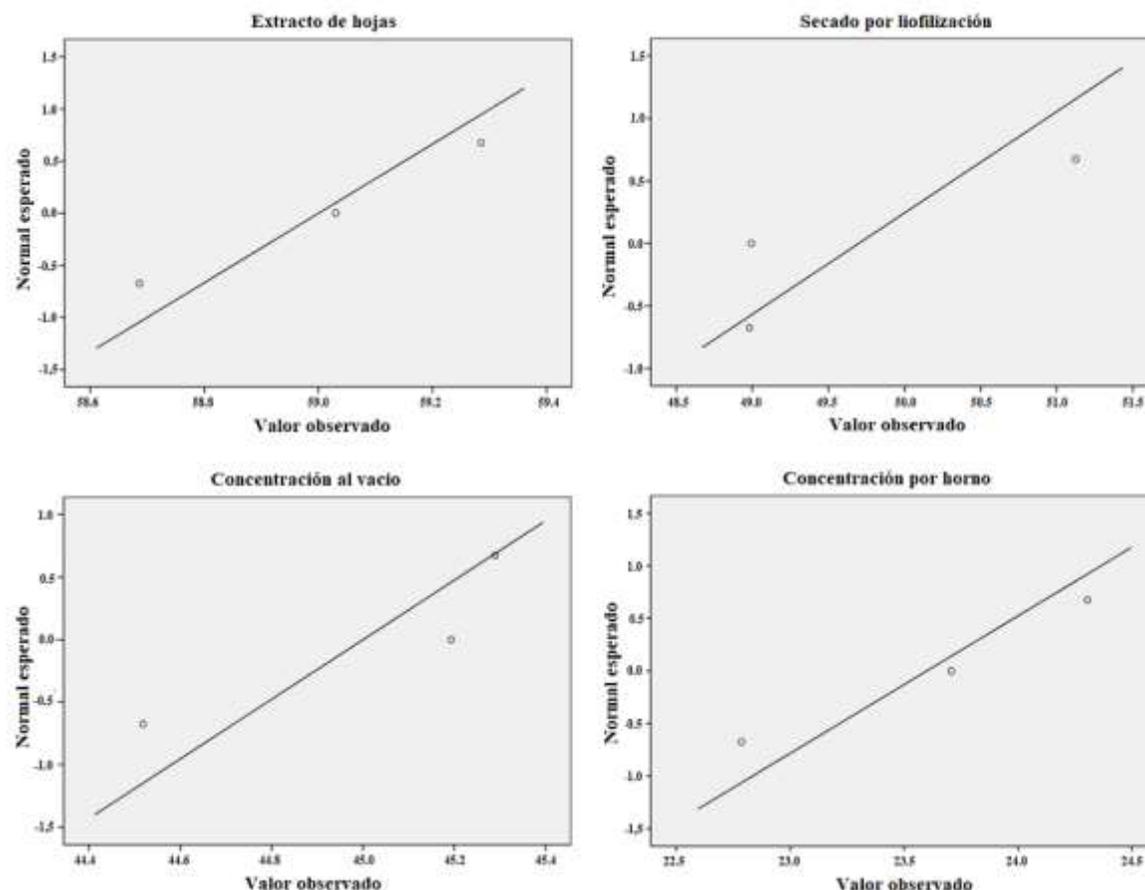


Figura 6.1 Q-Q normal del contenido de vitamina C para los diferentes extractos.

6.1.2 ANOVA para el contenido de vitamina C

La tabla 6.3, muestra una comparación entre los datos de cada método, ya que se requiere conocer si existe diferencia significativa entre ellos. El valor de significancia que nos proporciona la prueba ANOVA es de 0.00 siendo este menor que 0.05, Esto significa que al menos uno de los tratamientos tiene diferencias significativas.

Tabla 6.3 ANOVA para vitamina C.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2022.759	3	674.253	1135.723	0.000
Intra-grupos	4.749	8	0.594		
Total	2027.509	11			

En la tabla 6.4 se encuentran valores entregados por el análisis post-hoc, los cuales son necesarios para saber entre cuales tratamientos existen diferentes significativas, ya que el ANOVA de la tabla 6.3, solo nos dice que al menos uno es diferente, pero no nos da más detalles.

En la segunda sección se encuentra la prueba de Tamhane la cual hace las debidas comparaciones entre cada tratamiento. Primeramente, se compara el extracto de hojas de MO con los métodos de concentración y secado, se puede ver que todos los valores de significancia son menores de 0.05, indicando claras diferencias significativas.

En la segunda y tercera comparación hecha para el secado por liofilización y concentración al vacío respectivamente, los valores de significancia son menores de 0.05 cuando se compara con el concentrado en horno y el extracto inicial, mostrando diferencias. En cambio, cuando el secado por liofilización y concentración al vacío se comparan entre sí, el valor de significancia es de 0.084, siendo este valor mayor a 0.05, al analizar este caso, podemos decir que no existen diferencias significativas.

Para la tercera comparación hecha entre el método de concentración por horno y los demás tratamientos se toma la hipótesis alternativa que nos expresa la diferencia significativa, ya que todos los valores de significancia son menores de 0.05.

Para una mejor explicación de los que se plantea en las tablas, mostramos la figura 8.2 de medias de valores de vitamina C contra los métodos de secado. Se puede notar que los valores de medias del extracto de hojas y concentración por horno se alejan de los dos puntos centrales, en cambio el secado por liofilización y concentración al vacío, están más cercanos entre sí en relación a los otros, aunque estos estén cercanos se ve que hay claras diferencias, pero según la prueba de Tamahane estas no son significativas.

Tabla 6.4 Prueba Post-Hoc para el análisis de vitamina C.

	(I) Método de secado	(J) Método de secado	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	Extracto de las hojas	Secado por Liofilización	9.30169*	.62911	0.000
		Concentración al Vacío	14.00052*	.62911	0.000
		Concentración por Horno	35.40107*	.62911	0.000
	Secado por Liofilización	Extracto de las hojas	-9.30169*	.62911	0.000
		Concentración al Vacío	4.69883*	.62911	0.000
		Concentración por Horno	26.09938*	.62911	0.000
	Concentración al Vacío	Extracto de las hojas	-14.00052*	.62911	0.000
		Secado por Liofilización	-4.69883*	.62911	0.000
		Concentración por Horno	21.40055*	.62911	0.000
	Concentración por Horno	Extracto de las hojas	-35.40107*	.62911	0.000
		Secado por Liofilización	-26.09938*	.62911	0.000
		Concentración al Vacío	-21.40055*	.62911	0.000
Tamhane	Extracto de las hojas	Secado por Liofilización	9.30169*	.73327	0.024
		Concentración al Vacío	14.00052*	.29833	0.000
		Concentración por Horno	35.40107*	.47446	0.000
	Secado por Liofilización	Extracto de las hojas	-9.30169*	.73327	0.024
		Concentración al Vacío	4.69883	.75263	0.084
		Concentración por Horno	26.09938*	.83819	0.000
	Concentración al Vacío	Extracto de las hojas	-14.00052*	.29833	0.000
		Secado por Liofilización	-4.69883	.75263	0.084
		Concentración por Horno	21.40055*	.50386	0.000
	Concentración por Horno	Extracto de las hojas	-35.40107*	.47446	0.000
		Secado por Liofilización	-26.09938*	.83819	0.000
		Concentración al Vacío	-21.40055*	.50386	0.000

Otro gráfico importante es el mostrado en la figura 6.3, ya que este nos da una idea de la dispersión que tienen nuestros datos.

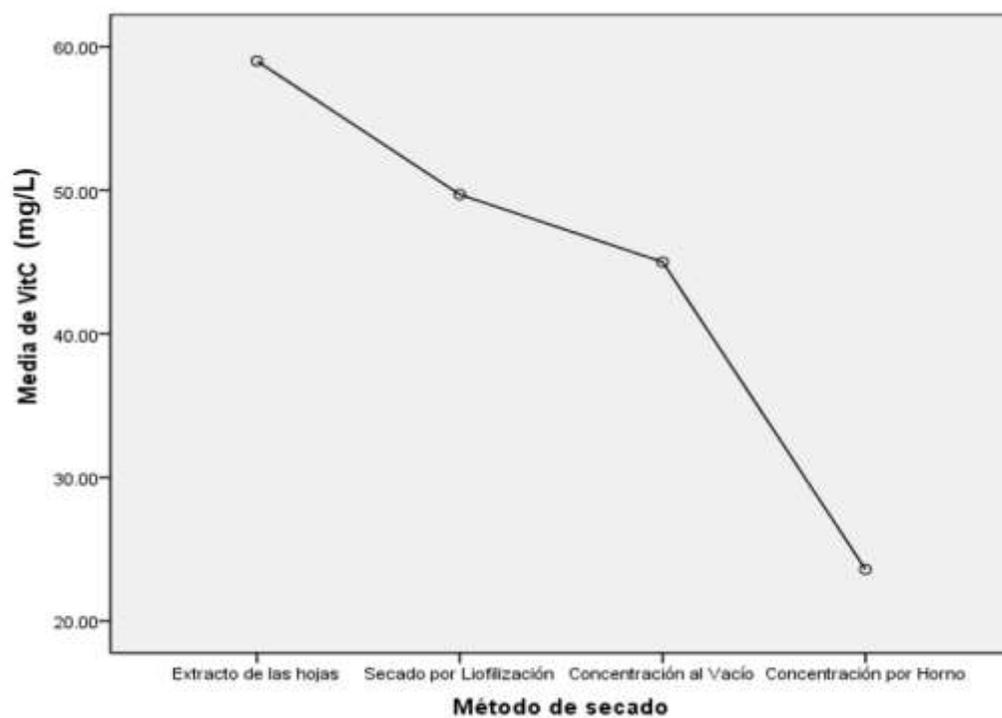


Figura 6.2 Media de vitamina C vs el método de concentración y secado.



Figura 6.3 Vitamina C vs Método de concentración y secado.

Para el extracto de las hojas se puede ver que los datos están concentrados entre el 25 y 75%, en cambio, en el secado por liofilización la caja está casi sobre el límite inferior mostrando mayor dispersión de datos entre el límite superior y el primer cuartil, también se observa la mediana desplazada hacia el tercer cuartil, el significado de esto es, que los datos se encuentran concentrado en el último 25%, entre el tercer cuartil y el límite inferior, este resultado concuerda con la conclusión de que los datos de este tratamientos no siguen un comportamiento de normalidad. Para los demás tratamientos, se puede concretar que su dispersión muestra una baja variabilidad en la distribución de los datos.

6.1.3 Determinación del contenido de vitamina C

El contenido de vitamina C (mg/mL) determinado por HPLC se muestra en la tabla 6.5. Se calculó el porcentaje de degradación para cada proceso de concentración y secado en base al lixiviado inicial.

En el caso de las pérdidas de vitamina C, el extracto secado por liofilización y el extracto concentrado al vacío en rotavapor presentaron una baja degradación de ácido ascórbico; en cambio, los sólidos concentrados por medio de horno convectivo sufrieron una considerable afectación debido al prolongado tiempo y altas temperaturas que fue expuesto.

Tabla 6.5 Resultados de la determinación del contenido del ácido ascórbico.

Muestra	Ácido Ascórbico (mg/L)	Porcentaje de degradación ^a
EH	59.0 ± 0.3	-
SL	49.7 ± 0.6	15.8 %
EV	45.0 ± 0.4	23.7 %
HC	23.6 ± 0.7	60.0 %

^aLos porcentajes fueron calculados en base EH.

6.2 Eficiencia antioxidante

6.2.1 Análisis estadístico de la capacidad antioxidante

El análisis estadístico para la capacidad antioxidante de los extractos se llevó a cabo comprobando inicialmente la normalidad de cada grupo de datos, con fin de conocer si estos datos se distribuyen normalmente, ya que es un criterio necesario para aplicar el ANOVA.

6.2.1.1 Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para cada grupo de datos

En la tabla 6.6 se muestra los parámetros necesarios para conocer si los datos observados siguen una distribución normal. Así mismo se muestran dos pruebas para la normalidad, Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Para la primera prueba antes mencionada el valor de la significancia no se muestra, esto se debe a que los datos que analizados son menores que los requeridos.

La prueba de Shapiro-Wilk nos da un valor de significancia de 0.929 para el extracto de las hojas, 0.797 para el secado por liofilización, 0.883 para la concentración al vacío y 0.200 para concentración por horno, ya que estos valores son mayores de 0.05, se considera que los datos se distribuyen normalmente.

Tabla 6.6 Pruebas de normalidad para EA de los extractos de hojas de *Moringa oleifera*.

Método de secado	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
AE Extracto de las hojas	0.184	3.000	0.000	0.999	3.000	0.929
AE Secado por Liofilización	0.216	3.000	0.000	0.989	3.000	0.797
AE Concentración al vacío	0.195	3.000	0.000	0.996	3.000	0.883
AE Concentración por Horno	0.347	3.000	0.000	0.834	3.000	0.200

A manera de comprobación, en la figura 6.4, se muestran 4 gráficos Q-Q con los valores de eficiencia antioxidante vs el correspondiente cuantil gaussiano. Esto con el objetivo de observar cuan cerca está la distribución de cada conjunto de datos a la distribución normal Gaussiana teórica. Se interpreta que los datos siguen una distribución normal ya que los puntos se encuentran cercanos a la recta de ajuste.

Unos de los requisitos para realizar el ANOVA es demostrar si las varianzas son homogéneas o heterogéneas. Por esta razón se hizo la prueba de Levene la cual se muestra en la tabla 6.7.

Tabla 6.7 Prueba de homogeneidad de varianzas.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.178	3	8	0.377

Según los datos obtenidos de la prueba de Levene, la significancia es de 0.377, la cual es mayor a 0.05, esto indica que aceptamos la hipótesis de que hay igualdad entre las varianzas de cada tratamiento.

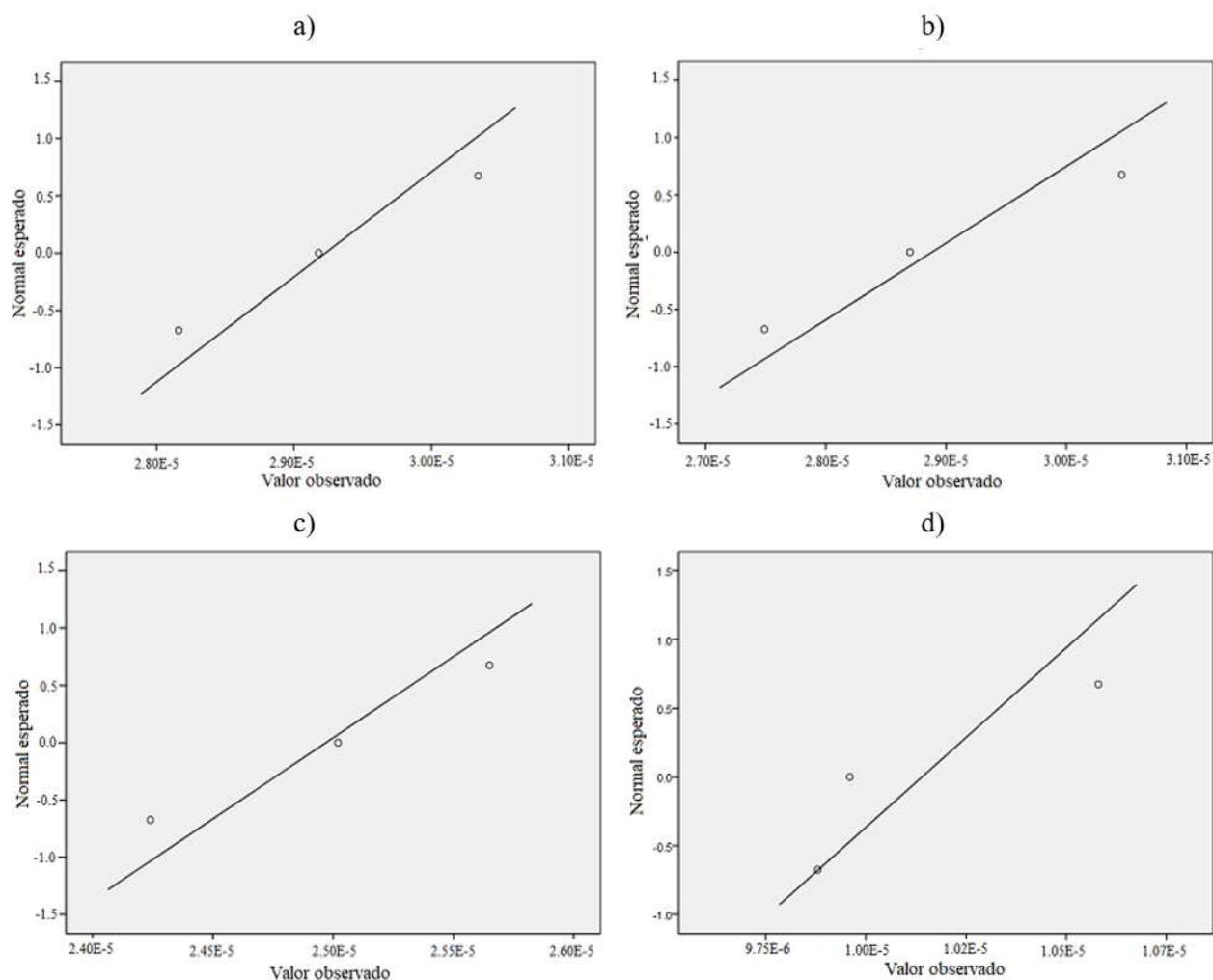


Figura 6.4 Q-Q normal de Eficiencia Antioxidante para los diferentes extractos a) Extracto de las hojas, b) Secado por liofilización, c) concentración y secado por rotavapor, d) Concentración y secado por horno.

6.2.1.2 ANOVA para la Eficiencia Antioxidante y pruebas post hoc

En la sección 6.2.1.1 se hicieron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza entre los grupos de datos obtenidos de cada tratamiento, lo que nos lleva a realizar la tabla ANOVA.

La tabla 6.8, nos arroja el estadístico F con su nivel de significancia, lo cual es necesario para responder a las hipótesis planteadas. A como se puede observar la significancia de la prueba es $p < 0.005$, esto nos indica que la hipótesis nula se rechaza, y aceptamos la hipótesis alternativa, lo cual nos expresa que al menos uno de los métodos de secado presentó una diferencia significativa en la eficiencia antioxidante respecto a los demás. En la prueba post hoc, se detallará cuáles son las diferencias entre cada tratamiento.

Tabla 6.8 Tabla ANOVA para los datos obtenidos de EA de cada tratamiento.

	Suma de cuadrados	gl	Media quadratic	F	Sig.
Inter-grupos	0.000	3	0.000	238.349	0.000
Intra-grupos	0.000	8	0.000		
Total	0.000	11			

La prueba post hoc mostrada en la tabla 6.9, se llevó a cabo para distinguir las diferencias de EA entre cada tratamiento, ya que, primeramente, se compara el extracto de las hojas con el secado por liofilización, concentración al vacío y concentración por horno, obteniendo un valor de significancia de 0.974, 0.004 y 0.000, respectivamente.

La interpretación para estos valores de significancia es la siguiente: para el secado por liofilización se concluye que no hay diferencias significativas con respecto al extracto inicial, ya que $0.794 > 0.05$. Para los demás tratamientos se puede decir que existen diferencias significativas con respecto al extracto de *Moringa oleifera*.

Tabla 6.9 Prueba post hoc para EA entre los distintos tratamientos.

(I) Método de secado		(J) Método de secado	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
HSD de Tukey	Extracto de las hojas	Secado por Liofilización	.00000034333	0.974
		Concentración al Vacío	.00000425667*	0.004
		Concentración por Horno	.00001908667*	0.000
	Secado por Liofilización	Extracto de las hojas	-.00000034333	0.974
		Concentración al Vacío	.00000391333*	0.006
		Concentración por Horno	.00001874333*	0.000
	Concentración al Vacío	Extracto de las hojas	-.00000425667*	0.004
		Secado por Liofilización	-.00000391333*	0.006
		Concentración por Horno	.00001483000*	0.000
Concentración por Horno	Extracto de las hojas	-.00001908667*	0.000	
	Secado por Liofilización	-.00001874333*	0.000	
	Concentración al Vacío	-.00001483000*	0.000	

Variable dependiente: Eficiencia Antioxidante (AE)

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Para la segunda comparación realizada por la prueba de Tukey entre el secado por liofilización y los demás tratamientos, se puede observar que entre el extracto de las hojas y el secado por liofilización no hay diferencias significativas, comprobando los resultados de la primera comparación. Con respecto a los demás tratamientos, los valores de significancia son menores de 0.05, lo que nos indica que existe diferencias significativas entre el secado por liofilización y concentración por horno y rotavapor.

En el tercer recuadro se hace la comparación de la concentración al vacío del extracto con los demás tratamientos, todos los valores mostrados de significancia son menores a 0.05, esto quiere decir que existe diferencias significativas entre los demás tratamientos y el método de concentración al vacío. La última comparación es la del método de concentración por horno con los demás tratamientos, donde podemos concluir de igual manera que la comparación anterior, ya que, los valores de significancia entregados por la prueba son menores a 0.05, aceptando la hipótesis que establece que existen diferencias significativas.

La figura 6.6, es un gráfico de caja y bigotes para los valores de eficiencia antioxidante de cada tratamiento. La distribución de datos del extracto de hojas de *Moringa* y del extracto concentrado al vacío es similar y ambas caen casi dentro del mismo rango. Los demás tratamientos mostraron un resultado totalmente distinto en la eficiencia antioxidante, con menores valores de eficiencia.

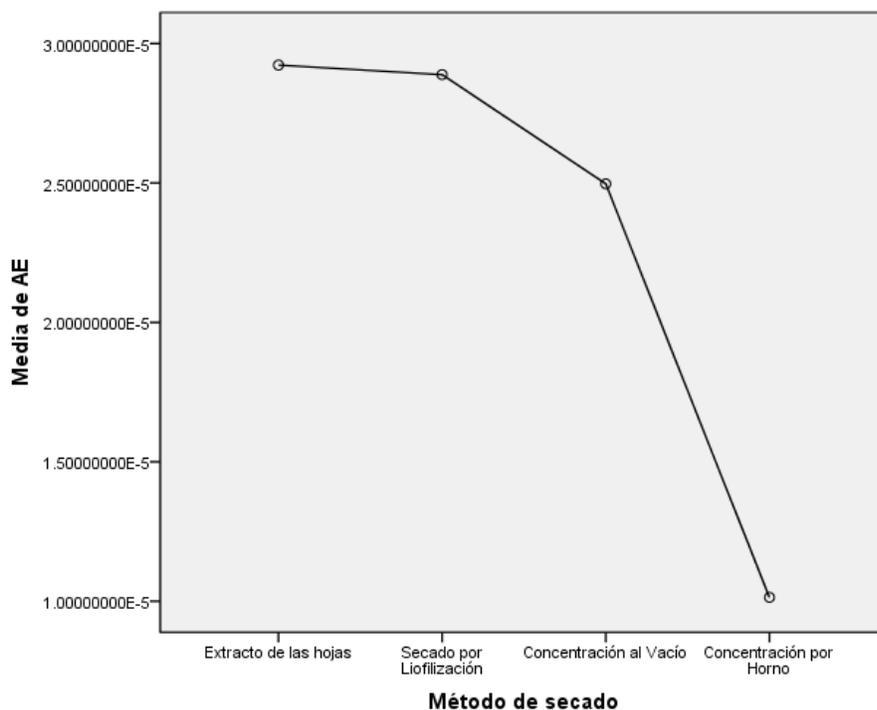


Figura 6.5 Media de las eficiencias antioxidantes versus método de secado.

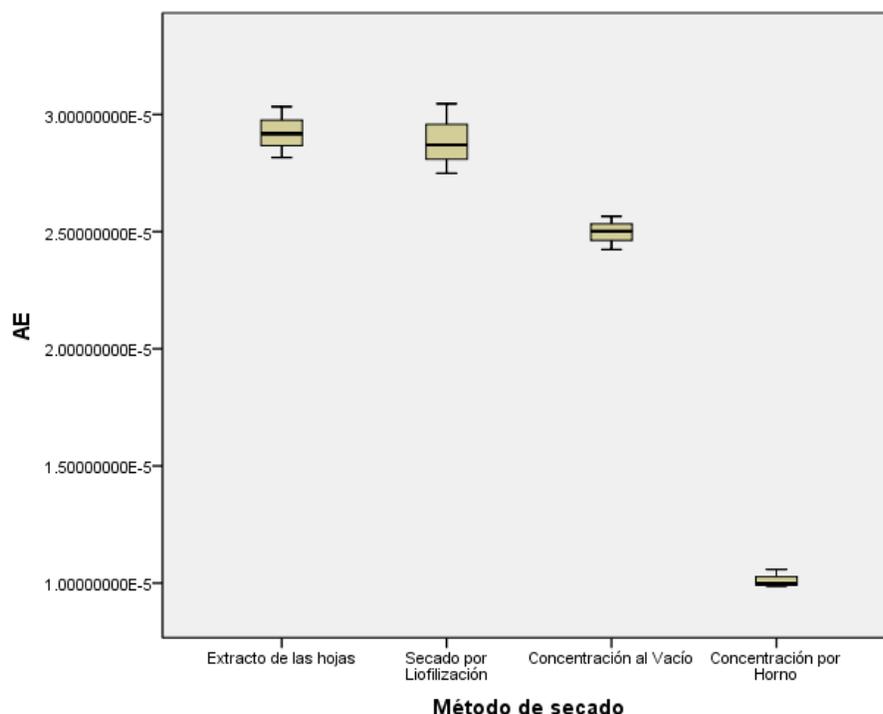


Figura 6.6 Eficiencia antioxidante vs método de secado.

Para una mejor comprensión de lo que se muestra en la tabla 6.9, en la figura 6.5, se muestra el comportamiento de los valores de las medias de EA vs cada tratamiento. Entre los valores de EA del extracto de *Moringa* y el extracto secado por liofilización de *Moringa oleifera*, se observa que las medias están relativamente cercanas entre sí, con respecto a los valores de los demás tratamientos, y el valor de EA del extracto de *Moringa* concentrado al vacío, se encuentra en un punto medio, pero lejano a los valores de los demás tratamientos, y por último con el valor más bajo de EA se encuentra el extracto concentrado por horno, en este se puede notar lo alejado que se encuentra de los demás valores; cabe destacar, que todas estas conclusiones que se han hecho a partir de lo que muestra la figura. 6.5, están respaldadas por los valores que nos proporcionó la prueba de Tukey.

6.2.2 Eficiencia antioxidante del ácido ascórbico

En la figura 6.7, se muestra el comportamiento cinético del ácido ascórbico contra DPPH. Donde se puede ver que a mayor concentración de ácido ascórbico menor el porcentaje de remanencia de DPPH. También se observa que cercano a los 0.2 minutos después de haber iniciado la reacción comienzan pequeñas variaciones en la concentración de DPPH tendiendo a la estabilidad.

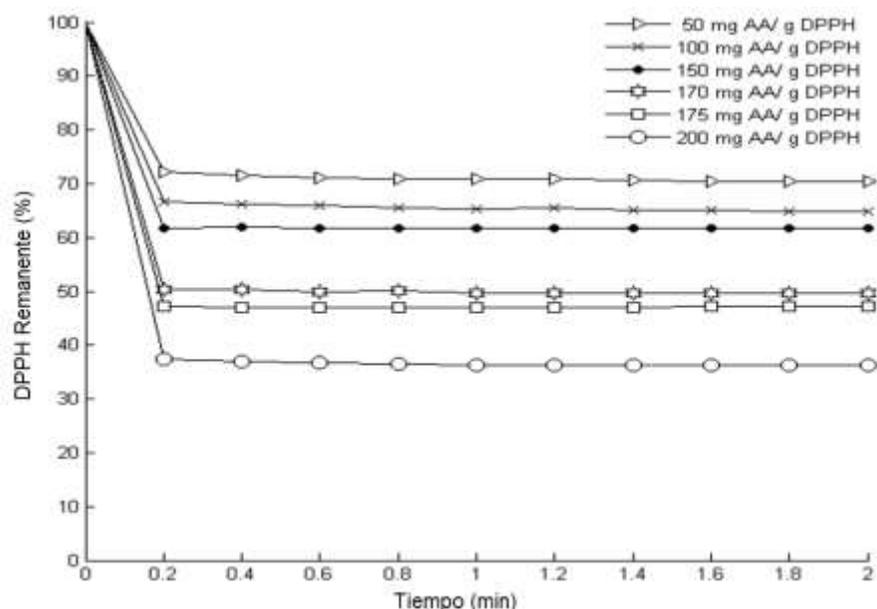


Figura 6.7 Datos cinéticos del Ácido ascórbico a diferentes concentraciones frente a DPPH con una concentración de 0.025 mg/mL.

Después de graficar las diferentes concentraciones de vitamina C contra DPPH se encontró que se necesitan 170 mg AA/g para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%, y el tiempo necesario para que la reacción alcance la estabilidad fue de 1 minuto. Estos valores de tiempo y concentración nos indican una alta eficiencia antioxidante de esta vitamina, ya que la concentración es relativamente baja comparada a otros antioxidantes como vitamina E. Por otro lado, al estabilizarse en 1 minuto nos demuestra la rápida reactividad de la vitamina C contra los radicales libre generados por DPPH. El valor de la eficiencia antioxidante se muestra en la tabla 6.10.

6.2.3 Curva de calibración de la concentración de DPPH versus absorbancia.

Para calcular la concentración de DPPH se realizó una curva de calibración tomando cuatro concentraciones entre 0 y 0,02 mg/mL las cuales se graficaron con sus respectivos valores de absorbancias.

La ecuación que describe la función lineal es:

$$A_{517\text{ nm}} = 62 \times [\text{DPPH}^*]_t + 0.0122 \quad (6.1)$$

Donde [DPPH*] esta expresado en g/L con $r^2 = 0.9996$.

El porcentaje de remanencia de DPPH' (% DPPH' REM] fue calculado de la siguiente manera:

$$\%DPPH'_{REM} = [DPPH']_t / [DPPH']_{t=0} \quad (6.2)$$

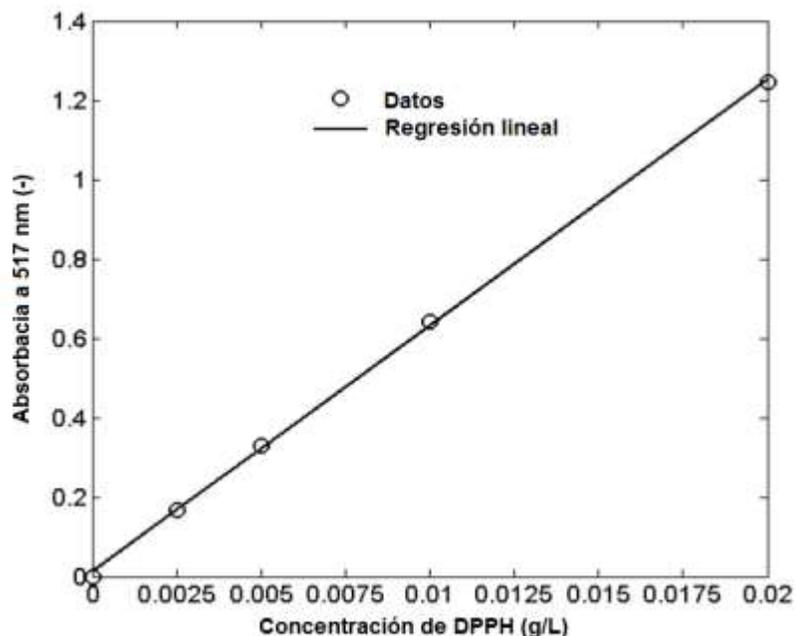


Figura 6.8 Correlación lineal entre la concentración de DPPH' y absorbancia a 517 nm.

6.2.4 Eficiencia antioxidante del extracto de hojas de *Moringa oleifera* antes y después de los métodos de concentración y secado

En la figura 6.9 se muestra el comportamiento de los datos experimentales de los extractos para la determinación de EC₅₀ y t_{EC50}, el cual permite visualizar el porcentaje remanente de DPPH en función del tiempo, cuando se está dando la reacción entre el radical libre DPPH y el agente antioxidante.

En el caso de a) que es el extracto inicial, se presentan las relaciones de concentración de 18720 mg solidos/g DPPH, 3600 mg solidos /g DPPH, 2880 mg solidos /g DPPH y 2700 mg solidos /g DPPH. En este caso se puede observar que, de las diferentes curvas representadas en la figura, la que alcanza el 50% de remanencia del DPPH representa la concentración de 2880 mg solidos /g DPPH con un tiempo t_{EC50} de 11.8 min.

La sección (b) de la figura 6.9, pertenece al extracto secado por liofilización, donde se observa cuatro curvas formadas por diferentes concentraciones del extracto, 18000 mg solidos/g DPPH, 3420 mg solidos/g DPPH, 2700 mg solidos/g DPPH y 2340 mg solidos/g DPPH. La concentración EC₅₀ es 3420 mg solidos/g DPPH y el tiempo observado t_{EC50} es 10.1 minutos.

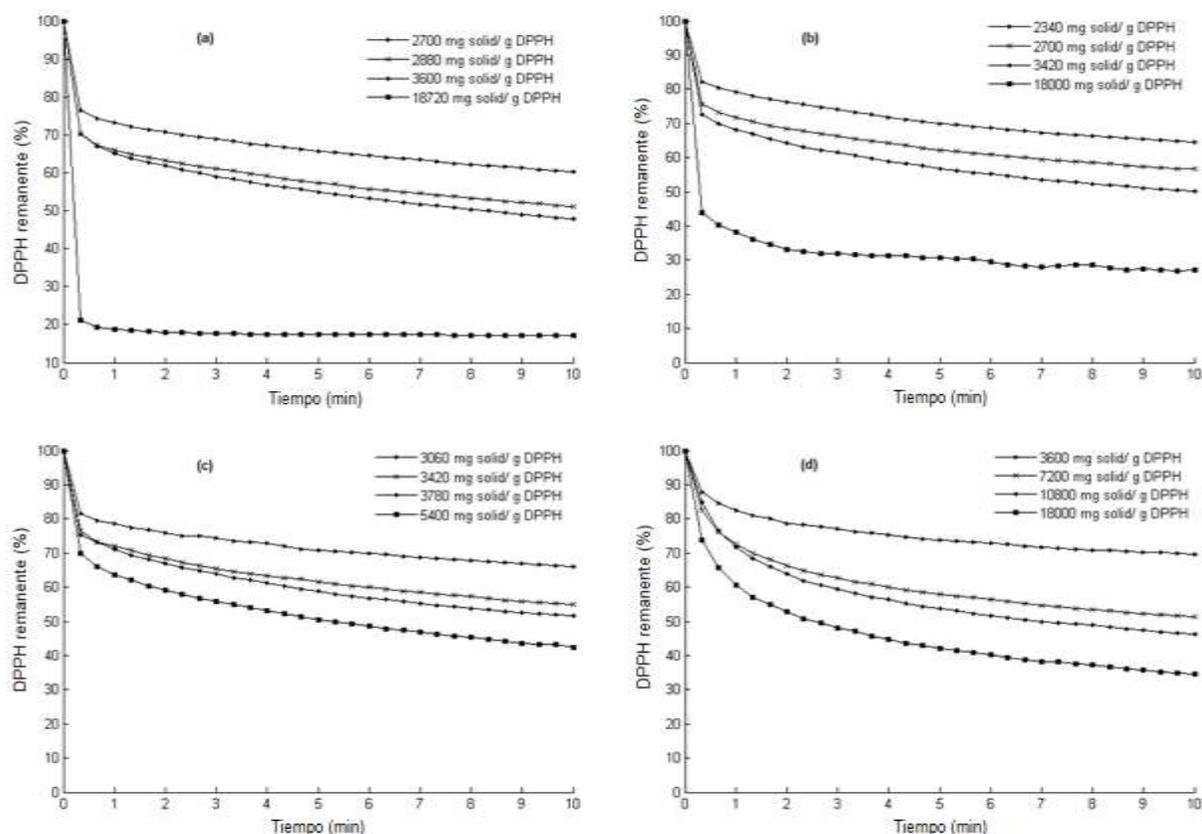


Figura 6.9 Comportamiento de datos experimentales obtenidos de la reacción entre los diferentes extractos contra DPPH (a) Extracto antes de la concentración y secado, (b) Extracto secado por liofilización, (c) Extracto concentrado al vacío mediante rota vapor, (d) Extracto concentrado por horno convectivo.

En las secciones (c) y (d) de la figura 6.9, se observa el mismo comportamiento de los demás datos experimentales, el cual se caracteriza por una reacción rápida en los primeros 60 segundos seguida de una lenta.

El valor de EC_{50} para el extracto concentrado al vacío (c) es 3780 mg solidos/g DPPH con tiempo t_{EC50} de 10.0 minutos y el valor de EC_{50} para el extracto concentrado por horno convectivo es 7200 mg solidos/g DPPH con tiempo t_{EC50} de 12.2 minutos.

La estabilidad de la reacción se hizo tomando en cuenta que el DPPH es propenso ser reducido por la luz y el tiempo en solución, por lo tanto, la reacción entre un antioxidante y el DPPH puede llegar a alcanzar la estabilidad, aunque al medir la absorbancia se noten pequeñas variaciones. Cabe destacar que cada valor de concentración y tiempo es producto de tres ensayos, el valor de EC_{50} y t_{EC50} se muestra en la tabla 6.10.

Los comportamientos observados en la figura 6.9, entre los extractos con diferentes tratamientos y DPPH a la misma concentración presentan la misma tendencia, la diferencia entre cada extracto es la cantidad de antioxidantes que están presente en ellos, por lo que se necesitan distintas concentraciones según sea el tratamiento para alcanzar EC_{50} .

Tabla 6.10 Parámetros estimados del ensayo de DPPH.

Muestra	EC ₅₀ (mg sólido g ⁻¹ DPPH [·]) ^a	t _{EC50} (min) ^a	EA (g DPPH [·] mg ⁻¹ sólido·min ⁻¹)	Clasificación cinética ^b	EA Clasificación ^b	EA Degradación ^c
Vitamina C	169.38 ± 6.4	1.0 ± 0.1	5.903 E-3	Rápido	Alto	-
EH	2902.5 ± 14.8	11.8 ± 0.5	2.922 E-5	Intermedio	Bajo	-
SL	3433.1 ± 85.2	10.1 ± 0.3	2.888 E-5	Intermedio	Bajo	1.2 %
EV	3980.1 ± 37.2	10.0 ± 0.2	2.495 E-5	Intermedio	Bajo	14.6 %
HC	8123.5 ± 263.3	12.2 ± 0.8	1.014 E-5	Intermedio	Bajo	65.3 %

^aCada valor es la media ± la desviación estándar.

^bClasificación de acuerdo a Sankhian, N. (2013)

^cLos porcentajes fueron calculados considerando el extracto de hojas (EH) como base.

A como se esperaba, el extracto con el valor de EC₅₀ más pequeño es el que no tuvo ningún tratamiento para su concentración o secado, logrando conservar los compuestos antioxidantes obtenidos en la lixiviación, seguido del extracto liofilizado, el cual se sometió a bajas temperaturas y presiones, logrando extraer el agua por medio de la sublimación, su valor de EC₅₀ aumentó un 18.28%, para el extracto concentrado al vacío y el extracto concentrado por horno convectivo los aumentos fueron de 37.12 y 179.87 % respectivamente, estos datos de porcentajes fueron calculados en base a la concentración EC₅₀ del extracto antes de la concentración o secado.

Según la clasificación de la cinética hecha en base a los datos obtenidos de la vitamina C y los extractos, se deduce que la vitamina C reacciona mucho más rápido que la mezcla de compuestos antioxidantes contenidos en los extractos, debido a que estos contienen compuestos con diferente reactividad.

6.3 Evaluación de la reactividad del extracto de la hoja de *Moringa oleífera* frente al radical libre DPPH, a partir de la determinación de la constante de velocidad k₂

En el extracto de las hojas de *Moringa oleífera* se encuentra una amplia variedad de antioxidantes entre ellos ácido ascórbico, ácido deshidro-ascórbico, vitamina E, compuestos fenólicos, taninos etc.

La reactividad de los compuestos antioxidantes contenidos en dicho extracto se evaluó a partir de la determinación de la constante de velocidad k₂ considerando una temperatura constante de 25 °C.

Se prepararon cuatro soluciones con las siguientes concentraciones en mg/ml: 0.0462, 0.0920, 0.1370 y 0.2300. A cada concentración de extracto que reaccionó con DPPH, se le hizo un seguimiento de absorbancia a 517 nm en función del tiempo, con intervalos de 30 segundos.

A continuación, se muestra la figura 6.10 la cual es una gráfica del extracto de hojas de *Moringa* a diferentes concentraciones frente a DPPH.

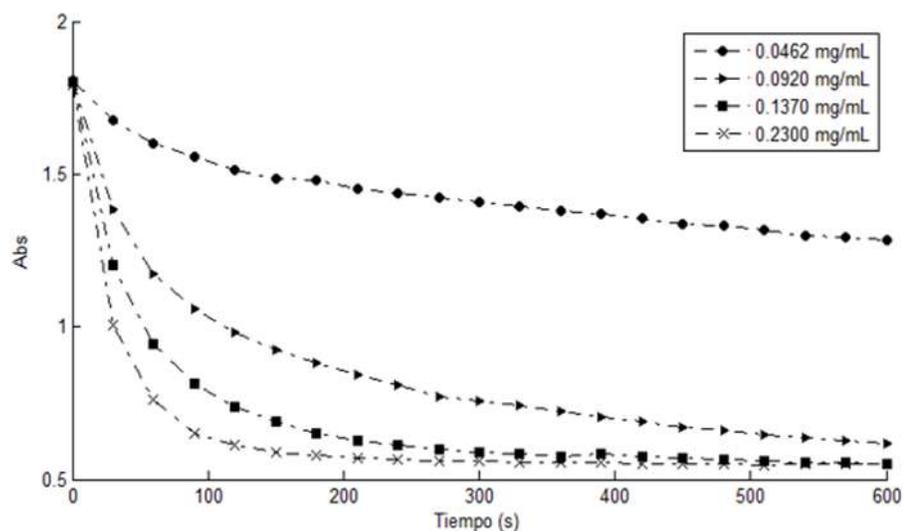


Figura 6.10 Comportamiento de datos experimentales para la reacción entre la mezcla de antioxidantes contenidos en el extracto de hojas de *Moringa* oleifera frente a DPPH.

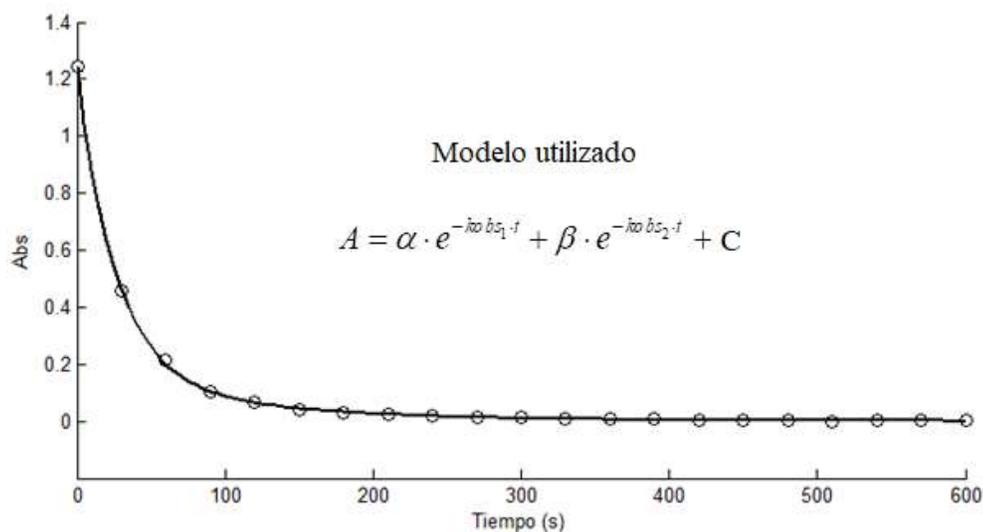


Figura 6.11 Ajuste de los datos obtenidos al monitorear la reacción del extracto de las hojas de *Moringa oleifera* contra DPPH, usando un modelo bi-exponencial. (Los puntos representan los datos y la línea el ajuste).

Como se puede observar en la figura 6.10, existe un decaimiento rápido en los primeros 100 segundos aproximadamente, seguido de uno más lento, debido a la mezcla de diferentes compuestos antioxidantes, ya que la velocidad con la que algunos compuestos reaccionan es mayor que otras.

De ahí surge la necesidad de hacer una modelación con una función exponencial de dos términos, con la cual el comportamiento de la disminución de la concentración de DPPH sea adaptado.

En la figura 6.11 se muestra el modelo matemático que se usó para ajuste de los datos de absorbancia vs tiempo obtenidos para cada concentración.

Las curvas generadas por la reacción entre el extracto frente a DPPH medida en absorbancia, fueron ajustadas al modelo antes expuesto, de la cual se obtuvieron los parámetros que se muestran en las tablas 6.11, 6.12 y 6.13.

Tabla 6.11 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos del ensayo 1.

Coeficientes	Concentraciones (mg/mL)			
	0.2300	0.1370	0.0920	0.0462
α	1.0210	0.7925	0.6123	0.2438
β	0.2211	0.4537	0.6355	0.7971
k_{obs1}	0.04061	0.03244	0.02803	0.01984
k_{obs2}	0.01126	0.00841	0.00374	0.00071
C	0.5494	0.5541	0.5528	0.7641
r^2	0.9999	0.9998	0.9998	0.9995

Tabla 6.12 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la primera réplica.

Coeficientes	Concentraciones (mg/mL)			
	0.2300	0.1370	0.0920	0.0462
α	1.011	0.7836	0.6136	0.2459
β	0.2301	0.4632	0.6338	0.8136
k_{obs1}	0.04068	0.03277	0.02787	0.02027
k_{obs2}	0.01158	0.00856	0.00372	0.00069
C	0.5490	0.5541	0.5523	0.7447
r^2	0.9999	0.9998	0.9997	0.9995

Tabla 6.13 Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la segunda réplica.

Coeficientes	Concentraciones (mg/mL)			
	0.2300	0.1370	0.0920	0.0462
α	1.038	0.7882	0.6034	0.2396

β	0.2034	0.3575	0.6398	0.6965
k_{obs1}	0.04007	0.03281	0.02857	0.02027
k_{obs2}	0.01080	0.00846	0.00385	0.00087
C	0.5489	0.5546	0.5574	0.8697
r^2	0.9999	0.9997	0.9999	0.9994

En la figura 6.12 se puede observar que la primera parte del decaimiento genera un valor de k_{obs1} , y la segunda parte genera el valor de k_{obs2} .

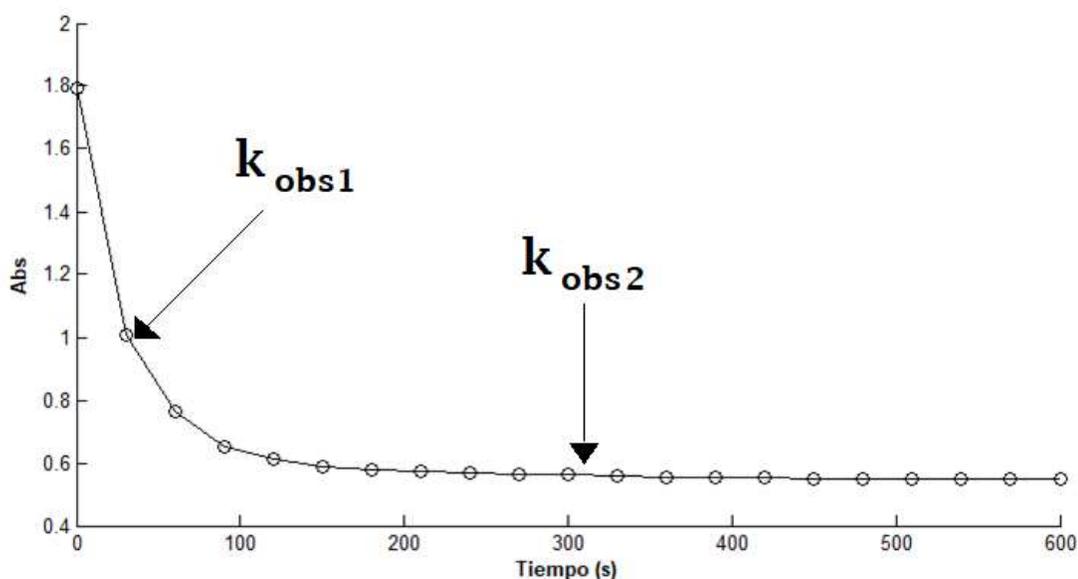


Figura 6.12 Comportamiento cinético de los datos experimentales en los cuales se observan los dos periodos de decaimiento exponencial representados por k_{obs1} y k_{obs2} .

Dentro de los parámetros obtenidos a través del modelo bi-exponencial se encuentran las constantes k_{obs1} y k_{obs2} las cuales son las constantes que caracterizan el decaimiento de las dos fases observadas en la figura 6.12. Por lo tanto, $k_{obs1} + k_{obs2} = k_{obs}$, la cual es la constante de pseudo primer orden de toda la reacción.

Los valores de k_{obs} se graficaron con respecto a las concentraciones iniciales del extracto de las hojas de *Moringa* oleífera como se ve en la figura 6.13.

En la tabla 6.14, se puede observar la ecuación de ajuste para cada réplica, con valores de r^2 por encima de 0.95, por lo cual se deduce que la constante de velocidad de pseudo-primer orden depende de la concentración.

Tabla 6.14 Parámetros obtenidos de la relación entre Kobs y concentración inicial de extractos.

Replicas	C1=0.2300	C2=0.1370	C3=0.0920	C4=0.0462	Ecuación de la recta	r ²
1	0.05187	0.040851	0.031775	0.0205590	y=0.1668x+0.01520	0.9666
2	0.05226	0.041330	0.031598	0.0209623	y=0.1679x+0.01534	0.9683
3	0.05087	0.041275	0.032393	0.0211407	y=0.1578x+0.01649	0.9532

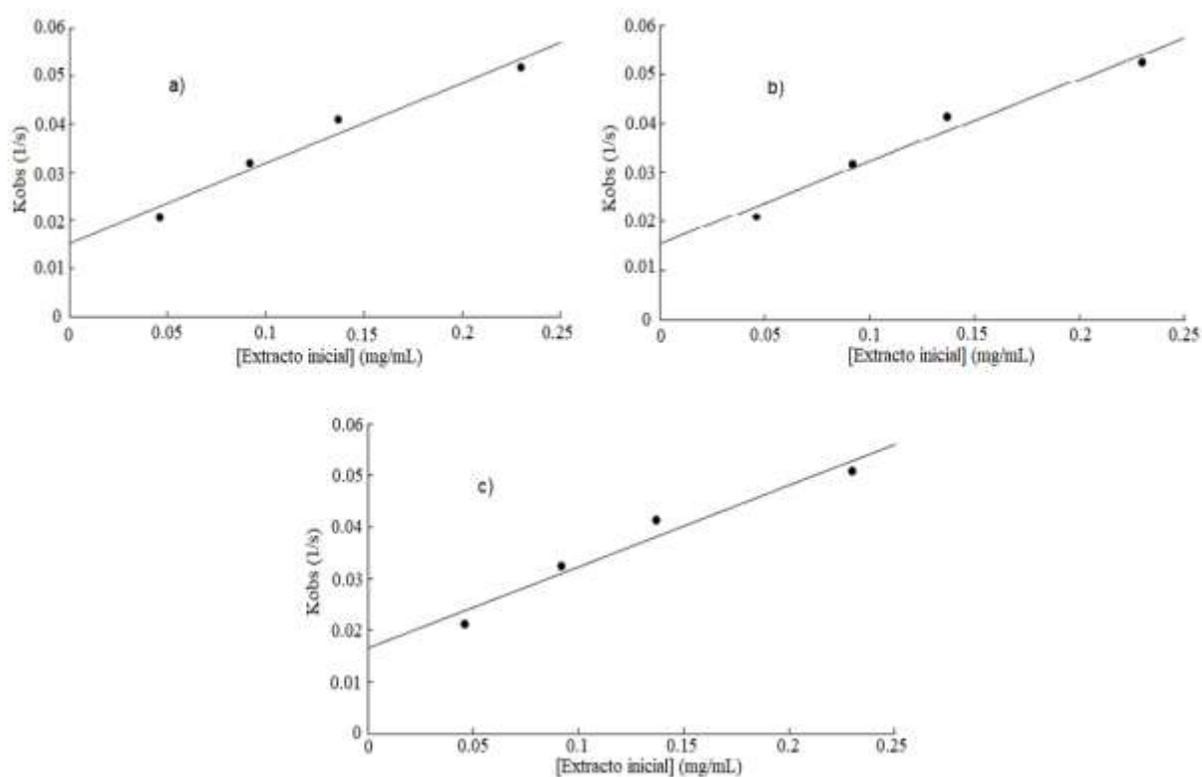


Figura 6.13 Relación de la constante de pseudo primer orden y la concentración inicial del extracto de la hoja de *Moringa oleifera*. Donde a), b) y c) son el ensayo y sus réplicas.

La constante de velocidad de segundo orden se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$-\frac{d[DPPH]_t}{dt} = kobs \cdot [DPPH]_t = k_2 \cdot [AH]_0 \cdot [DPPH]_t \quad (6.3)$$

El resultado obtenido fue 0.164 ± 0.005 (mg. mL⁻¹)-1/s. Este valor es resultado de la media de al menos 3 valores. Villanueva-Tiburcio *et al.* (2010) realizaron cálculos de las constantes de velocidad de segundo orden para extractos acuosos de cáscara de camu-camu madura, pintón y verde los cuales fueron 1.32 ± 0.11 (mg. mL⁻¹)-1/s, 4.04 ± 0.18 (mg. mL⁻¹)-1/s, 1.27 ± 0.02 (mg. mL⁻¹)-1/s, respectivamente.

Lebeau *et al.* (2000), Espín *et al.* (2000), y Ramos (2001) realizaron cálculos de reactividad con estándares puros siendo para flavonas $1,2$ (L. mol⁻¹)⁻¹/s, Vitamina E $1,87$ (mg. mL⁻¹)⁻¹/s, BHT $0,05$ (mg. mL⁻¹)⁻¹ /s, BHA $0,42$ (mg. mL⁻¹)⁻¹/s, té verde 2.3 (mg. mL⁻¹)⁻¹/s, hierba luisa 0.06 (mg. mL⁻¹)⁻¹/s, lo que significa que las muestras en estudio poseen una buena actividad de secuestro de radicales.

De acuerdo a resultados de otros investigadores y nuestro valor de la constante de velocidad para el extracto de la hoja de *Moringa oleifera*, se ordena de mayor a menor en función de la reactividad de los compuestos: Cáscara de camu-camu pintón > té verde > vitamina E > Cáscara de camu-camu maduro > Cáscara de camu-camu verde > flavonas > BHT > extracto de hoja de *Moringa oleifera* > BHT.

Con respecto a las hipótesis planteadas, después de hacer un ordenamiento de las especies y compuestos puros con sus respectivos valores de reactividad, podemos observar que el valor de k_2 para el extracto de hoja de *Moringa* es mayor que el de BHT, por lo tanto, podemos decir que aceptamos la hipótesis nula y concluimos que el valor de k_2 calculado para nuestro extracto se encuentra entre valores de antioxidantes comunes.

VII CONCLUSIONES

La degradación del contenido de vitamina C se vio afectada en 2.10 veces en el concentrado y secado por medio de horno y 1.10 veces para el concentrado y secado por rotavapor en comparación con el secado por liofilización. Tanto el secado por liofilización como el secado al vacío conservaron el contenido de vitamina C en un nivel significativamente similar respecto al contenido de vitamina C del extracto de las hojas.

De los tres procesos de concentración y secado de las hojas de *Moringa oleifera* evaluados, el que provocó la menor afectación de la eficiencia antioxidante fue el proceso de liofilización (SL), seguido de los procesos rotavapor (EV) y el horno (HC), debido a que la eficiencia antioxidante obtenida del extracto secado por SL es 1.15 veces mayor que EV y 2.84 veces mayor que HC.

La cinética de reacción es de segundo orden y el valor de la constante de velocidad ($k_2 = 0,164 \pm 0,005 \text{ mg} \cdot (\text{mL} \cdot \text{s})^{-1}$) determinada, ratifica que el extracto de hoja de MO tiene una reactividad en el rango de antioxidantes comunes utilizados en la industria de los alimentos, tales como el BHT y el BHA.

La EA obtenida en los extractos de este estudio, es 200 veces menor que la EA de la vitamina C pura ($5,903 \times 10^{-3} \text{ mg sólidos/g DPPH}$), esto se debe a que la vitamina C es uno de los antioxidantes más poderosos en reactividad y eficiencia y se utilizó como reactivo en estado puro, el cual tiene una alta capacidad captadora de radicales libres, y tiempo t_{EC50} bajo, mientras que los extractos necesitan un valor de t_{EC50} mayor.

VIII RECOMENDACIONES

En base a los resultados encontrados en este estudio, se hacen las siguientes recomendaciones:

Si se desea obtener extracto seco de las hojas de *Moringa oleifera*, el mejor método para llevar a cabo su secado es a través de la liofilización, ya que con este proceso se conservan al máximo las propiedades antioxidantes de dicha planta.

En caso de que resulte muy costoso la implementación de este método de secado, se podría acudir al método de concentración al vacío, ya que se encontró que es el método después de la liofilización que alcanza un alto valor en cuanto a la conservación de la efectividad antioxidante (85.4%) y la cantidad de vitamina C (76.3%) en las hojas de esta planta, y dichos porcentajes son aceptables.

Los resultados indican que al concentrar en horno convectivo se reduce la eficiencia antioxidante y degrada la vitamina C hasta un 35% y 40% del valor inicial, respectivamente, por lo que al someter a la hoja de *Moringa oleifera* a elevadas temperaturas es muy notoria la afectación que ocurre sobre ella, debido a que los compuestos que ésta contiene, como la vitamina C (que es uno de sus principales micronutrientes), son termosensibles; por lo tanto, no se recomienda el método de concentración por horno convectivo como una alternativa viable de procesamiento si se desea obtener extracto de hojas de *Moringa oleifera* concentrado.

Los cálculos de la constante de velocidad indican que la capacidad como antioxidante del extracto de hojas de *Moringa* es comparable a la de antioxidantes comerciales, por lo que este extracto concentrado de *Moringa* obtenido por liofilización o secado al vacío puede ser usado de manera directa o combinado con otros alimentos como fuente alta en nutrientes y antioxidantes.

Recomendamos que en caso que a esta área temática se le dé seguimiento con objetivos más ampliados en el futuro, se considere el secado por aspersión, ya que suele ser la tecnología más utilizada en procesos de secado de soluciones alimenticias.

Se recomienda que una vez se lleve a cabo uno de los métodos de concentración y secado recomendados, se empaque el producto al vacío para evitar que vuelva a absorber humedad del ambiente, se almacene protegido de la luz solar y se conserve a temperaturas bajas puesto que, al ser un concentrado alto en nutrientes, el concentrado de *Moringa* estará más susceptible a ser atacado por microorganismos y las altas temperaturas favorecen la degradación de las vitaminas y nutrientes.

IX NOMENCLATURA

<i>Símbolo</i>	<i>Definición</i>	<i>Unidades</i>
MO	<i>Moringa oleifera</i>	-
EH	Extracto de hojas de MO	-
EV	Evaporación al vacío por rotavapor	-
HC	Horno convectivo	-
SL	Secado por liofilización	-
EC ₅₀	Concentración de antioxidantes necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH al 50%.	mg sólidos/g DPPH
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil	-
EA	Eficiencia antioxidante	g DPPH / (mg de sólidos • min)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	-
AA	Ácido ascórbico o vitamina C	-
AC	Capacidad antioxidante	g DPPH/mg de sólidos
T _{EC50}	Tiempo en que la reacción entre el antioxidante con concentración EC ₅₀ y DPPH alcanzan estabilidad	-
k _{obs}	Constante de velocidad de pseudo primer orden	1/min
k ₂	Constante de velocidad de segundo orden	1/min • (mg/mL)
A _t	Absorbancia con respecto al tiempo	-
α, β y C	Coefficientes del modelo bi-exponencial	-
BHT	Butil hidroxitolueno	-
BHA	Butil hidroxianisol	-

X BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, K. S., Banik, R., Hossain, M. H., *et al.* (2015). Vitamin C (L-Ascorbic Acid) Content in Different Parts of Moringa Oleifera Grown in Bangladesh. American Chemical Science Journal, vol. 2(1) pp. 1-6.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., *et al.* (2002). Methods for testing antioxidant activity. The Royal Society of Chemistry, vol. 127 pp. 183-198.
- Asante, W. J., Nasare, I. L., Dery, D. T., *et al.* (2014). Nutrient composition of Moringa oleifera leaves from two agro ecological zones in Ghana. African Journal of Plant Science, vol. VIII(1) pp. 65-71.
- Aymard, C. y Belarbi, A. (2000). Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. Elsevier, vol. 27 pp. 612-618.
- Beltran, L. (2010). Evaluacion in vitro de la actividad antioxidante en leches fermentadas por *Lactococcus lactis*. Licenciatura en Nutrición (Monografía), Universidad Autónoma de Queretaro, México, pp. 79
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, vol. 181 pp. 1199-2000.
- Cabezas, C. (2008). Evaluacion nutritiva y nutraceútica de la mora de castilla (*Rubus glaucus*) deshidratada a tres temperatura por el método de secado de bandejas. Licenciatura en Bioquímico Farmacéutico (Monografía), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, pp. 124
- Campos, A. M., Duran, N., Alarcón, C. L., *et al.* (2012). Kinetic and Stoichiometric Evaluation of Free Radicals Scavengers Activities Based on Diphenyl-Picryl Hydrazyl (DPPH) Consumption. J.Chil.Chem.Soc, vol. 57(4) pp. 1381-1384.
- Castillos, J. T. (2013). Moringa oleifera: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. International Journal of experimental Botany, vol. 82 pp. 193-202.
- Ciancaglini, P., Santos, L., Daghatanli, K., *et al.* (2001). Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body. Biochemistry and Molecular Biology Education, vol. 29 pp. 110-114.
- Devendra, B., Srinivas, N., Prasad-Tallurid, V., *et al.* (2011). Antimicrobial activity of Moringa oleifera L. leaf extract against selected bacterial and fungal strains. International Journal of Pharma and Bio Sciences, vol. 2(3) pp. B13-B18.
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., *et al.* (2000). Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. J. Agric. Food Chem., vol. 48 pp. 1588-1592.
- Fahey, J. W. (2005). Moringa oleifera: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophyllactic Properties. Part 1. Trees for Life Journal

- Farooq, F., Rai, M., Tiwari, A., *et al.* (2012). Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants Research* vol. 6(27) pp. 4368-4374.
- Foti, M. C., Slavova-Kazakova, A., Rocco, C. A., *et al.* (2016). Kinetics of Curcumin Oxidation by 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH•) an Interesting Case of Separated Coupled Proton-Electron Transfer. *Organic & Biomolecular Chemistry*, (Aceptado para publicación).
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K. y Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human wellness*, vol. 5 pp. 49-56.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M., Ponce-Pardo, J., *et al.* (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, vol. 15(1) pp. 57-60.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Zamarripa-Colmenares, A. y Hernández-Durán, L. G. (2015). Calidad nutrimental y nutraceutica de hoja de *Moringa* proveniente de árboles de diferente altura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* vol. 6(2) pp. 317-330.
- Kapur, A. (2012). Spectrophotometric analysis of total ascorbic acid content in various fruits and vegetables. *Bulletin of the Chemists and technologists of Bosnia and Herzegovina*, vol. 38 pp. 39-42.
- Kudra, T. y Mujumdar, A. S. (2002). *Advanced Drying Technologies*, New York, Marcel Dekker. Inc
- Leal-Alturo, A. C. (2012). Determinación del potencial antioxidante y evaluación del coeficiente de reparto a 25,00 OC de metabolitos secundarios de una especie de líquen colombiano del género *Hypotrachyna*. pp.
- Moeslinger, T., Brunner, M., Volf, I., *et al.* (1995). Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid. *General Clinical Chemistry*, vol. 41(8) pp. 1177-1181.
- Moreno, C. S., Larrauri, J. A. y Calixto, F. S. (1997). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*
- Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., *et al.* (2011). Nutritional characterization of *Moringa oleifera* Lam.) leaves African *Journal of Biotechnology*, vol. 10(60) pp. 12925-12933.
- Mujumdar, A. (ed.) (2007). *Handbook of Industrial Drying*, 3ra Edición. New York: Taylor & Francis, pp. 259-262.
- Murtaza, M. A., Huma, N., Javaid, J., *et al.* (2004). Studies on stability of strawberry drink stored at different temperatures. *International Journal of agriculture and biology*, vol. 6(1) pp. 58-60.
- Nazar, A. O., Zeinab, K. M., Nigoud, Y. S. E., *et al.* (2015). Antibacterial and antifungal activity of different extract of *Moringa oleifera* leaves – An in-vitro study. *Journal of Microbiology and Biomedical Research*.

- Ndhlala, A. R., Mulaudzi, R. y Ncube, B. (2014). Antioxidant, Antimicrobial and Phytochemical Variations in Thirteen *Moringa oleifera* Lam. Cultivars. *Molecules*, vol. 19 pp. 10480-10494.
- Romero, B. F. (2008). Estabilidad de vitaminas, vida comercial y bioaccesibilidad de folatos - Hierro en fórmulas infantiles de continuación y crecimiento. (Tesis Doctoral), Universidad de Murcia, pp.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J. y Quinn, M. E. (2009). *HandBook Of Pharmaceutical Excipient* London, UK
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. y Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 76(2) pp. 270-276.
- Sankhian, N. (2013). Determination and comparison of vitamin C content from *Moringa oleifera* by different methods. *International Journal of Agricultural Science and Research*, vol. 3(2) pp. 67-70.
- Suja, K. P., Ayalekshmy, A. y Arumughan, C. (2004). Free Radical Scavenging Behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52(4) pp. 912-915.
- Talcott, S. T., Percival, S. S., Pittet, M. J., *et al.* (2003). Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 51(4) pp. 935-941.
- Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de Pereira, pp.
- Treybal, E. R. (1985). *Mass Transfer Operations*, Singapore, McGraw-Hill
- Valdés-Hernández, G. V., Cruz-Viera, L. y Comet-Rodríguez, R. (2015). Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, vol. 46 pp. 135-145.
- Vianna, D. R., Bubols, G., Meirelles, G., *et al.* (2012). Evaluation of the Antioxidant Capacity of Synthesized Coumarins. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13 pp. 7260-7270.
- Villanueva-Tiburcio, J. E., Condenzo-Hoyos, L. A. y Asquiere, E. R. (2010). Antocianinas, ácidos ascórbicos, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myciaria dubia*(H.B.K) Mc Vaugh). *Ciencias y Tecnologías de Alimentos*, vol. 30(1) pp. 151-160.
- Yang, R., Chang, L., Hsu, J., *et al.* (2006). Nutritional and Functional Properties of *Moringa* Leaves – From Germplasm, to Plant, to Food, to Health. *Moringa and other highly nutritious plant resources: Strategies, standards and markets for a better impact on nutrition in Africa*. [online], Accra, Ghana. Disponible en: <http://miracletrees.org/Moringa-doc/from-germplasm-to-plant-to-food-to-health.pdf>. Fecha de acceso: 16 de enero, 2017.

ANEXOS

Apéndice 1

Artículo Científico y Póster

Apéndice 2

Datos experimentales

TABLA 1. Valores de absorbancia vs tiempo, obtenidos al monitorear la concentración de DPPH frente al extracto de hojas de Moringa a diferentes concentraciones.

Tiempo (min)	La cantidad de gramos de sólidos esta dada por cada 1000 mg de DPPH											
	18720 mg sólidos			3600 mg sólidos			2880 mg sólidos			2700 mg sólidos		
0.000	1.791	1.795	1.791	1.780	1.781	1.780	1.790	1.790	1.788	1.776	1.775	1.776
0.333	0.375	0.379	0.381	1.263	1.235	1.253	1.261	1.256	1.248	1.360	1.357	1.361
0.667	0.340	0.347	0.348	1.210	1.170	1.201	1.213	1.201	1.192	1.321	1.319	1.322
1.000	0.330	0.339	0.343	1.173	1.143	1.157	1.187	1.180	1.168	1.301	1.299	1.299
1.333	0.324	0.331	0.332	1.150	1.122	1.139	1.168	1.161	1.152	1.283	1.281	1.283
1.667	0.321	0.328	0.327	1.130	1.104	1.115	1.151	1.148	1.140	1.270	1.266	1.266
2.000	0.318	0.325	0.324	1.113	1.085	1.107	1.136	1.134	1.128	1.258	1.254	1.256
2.333	0.317	0.321	0.321	1.097	1.068	1.088	1.122	1.118	1.107	1.245	1.242	1.243
2.667	0.315	0.318	0.319	1.081	1.053	1.070	1.109	1.106	1.098	1.236	1.231	1.233
3.000	0.314	0.317	0.318	1.066	1.038	1.048	1.098	1.097	1.088	1.225	1.220	1.221
3.333	0.313	0.315	0.317	1.053	1.026	1.039	1.086	1.083	1.074	1.214	1.210	1.212
3.667	0.312	0.313	0.316	1.040	1.012	1.022	1.074	1.070	1.060	1.203	1.200	1.199
4.000	0.312	0.312	0.314	1.026	1.002	1.010	1.063	1.059	1.048	1.195	1.192	1.194
4.333	0.311	0.310	0.315	1.014	0.991	1.002	1.053	1.048	1.039	1.184	1.182	1.183
4.667	0.311	0.310	0.315	1.002	0.978	0.995	1.043	1.038	1.029	1.177	1.174	1.175
5.000	0.310	0.309	0.315	0.991	0.968	0.978	1.034	1.029	1.018	1.168	1.166	1.167
5.333	0.310	0.309	0.314	0.981	0.959	0.967	1.025	1.020	1.009	1.162	1.159	1.159
5.667	0.310	0.308	0.314	0.970	0.947	0.957	1.016	1.011	0.997	1.152	1.151	1.151
6.000	0.309	0.308	0.313	0.961	0.936	0.949	1.007	0.998	0.989	1.147	1.144	1.143
6.333	0.310	0.308	0.313	0.951	0.925	0.934	0.999	0.990	0.983	1.140	1.137	1.139
6.667	0.311	0.307	0.314	0.942	0.916	0.929	0.992	0.985	0.975	1.134	1.130	1.131
7.000	0.312	0.308	0.314	0.934	0.908	0.919	0.984	0.978	0.965	1.127	1.123	1.126
7.333	0.310	0.307	0.314	0.925	0.900	0.912	0.977	0.970	0.958	1.120	1.117	1.115
7.667	0.310	0.307	0.311	0.916	0.889	0.906	0.969	0.963	0.950	1.109	1.110	1.109
8.000	0.309	0.306	0.312	0.907	0.881	0.893	0.962	0.955	0.944	1.101	1.104	1.102
8.333	0.310	0.306	0.312	0.900	0.872	0.894	0.956	0.949	0.936	1.098	1.099	1.099
8.667	0.308	0.307	0.313	0.893	0.865	0.883	0.948	0.942	0.928	1.092	1.093	1.093
9.000	0.308	0.306	0.312	0.887	0.857	0.874	0.942	0.936	0.921	1.086	1.088	1.087
9.333	0.308	0.306	0.312	0.878	0.852	0.864	0.937	0.930	0.915	1.080	1.083	1.081
9.667	0.310	0.306	0.312	0.874	0.845	0.855	0.931	0.924	0.908	1.075	1.078	1.075
10.000	0.310	0.306	0.311	0.866	0.839	0.849	0.926	0.917	0.901	1.070	1.073	1.071
10.333	0.310	0.306	0.311	0.861	0.834	0.844	0.924	0.912	0.900	1.066	1.068	1.067
10.667	0.310	0.306	0.311	0.857	0.830	0.840	0.920	0.909	0.897	1.062	1.063	1.063
11.000	0.310	0.306	0.311	0.854	0.826	0.836	0.917	0.906	0.893	1.058	1.060	1.059
11.333	0.310	0.306	0.311	0.851	0.823	0.832	0.913	0.903	0.890	1.055	1.057	1.055
11.667	0.310	0.306	0.311	0.848	0.820	0.829	0.910	0.900	0.888	1.053	1.054	1.053
12.000	0.310	0.306	0.311	0.847	0.818	0.826	0.910	0.899	0.887	1.052	1.051	1.053
12.333	0.310	0.306	0.311	0.848	0.817	0.827	0.909	0.899	0.886	1.052	1.050	1.052
12.667	0.310	0.306	0.311	0.848	0.817	0.827	0.910	0.898	0.887	1.052	1.051	1.052
13.000	0.310	0.306	0.311	0.848	0.817	0.826	0.910	0.899	0.887	1.052	1.049	1.052

TABLA 2. Valores de absorbancia vs tiempo, obtenidos al monitorear la concentración de DPPH frente al extracto secado por liofilización a diferentes concentraciones.

La cantidad de gramos de sólidos esta dada por cada 1000 mg de DPPH												
Tiempo(min)	18000 mg sólidos			3420 mg sólidos			2700 mg sólidos			2340 mg sólidos		
0.000	1.710	1.713	1.713	1.701	1.691	1.718	1.720	1.718	1.723	1.718	1.720	1.715
0.333	0.750	0.743	0.753	1.251	1.220	1.236	1.295	1.296	1.303	1.417	1.412	1.410
0.667	0.692	0.685	0.695	1.203	1.179	1.188	1.256	1.258	1.265	1.378	1.385	1.383
1.000	0.655	0.648	0.658	1.174	1.150	1.159	1.229	1.231	1.238	1.351	1.365	1.363
1.333	0.618	0.611	0.621	1.154	1.124	1.139	1.209	1.211	1.218	1.331	1.346	1.344
1.667	0.593	0.583	0.596	1.130	1.100	1.115	1.190	1.192	1.199	1.312	1.333	1.329
2.000	0.568	0.558	0.571	1.109	1.077	1.094	1.174	1.178	1.186	1.296	1.319	1.315
2.333	0.557	0.547	0.560	1.092	1.056	1.077	1.160	1.164	1.172	1.282	1.306	1.302
2.667	0.550	0.540	0.553	1.080	1.036	1.065	1.147	1.151	1.159	1.269	1.295	1.291
3.000	0.549	0.539	0.552	1.068	1.019	1.053	1.136	1.140	1.148	1.258	1.281	1.277
3.333	0.545	0.535	0.548	1.053	1.004	1.039	1.122	1.126	1.134	1.244	1.269	1.262
3.667	0.537	0.529	0.540	1.036	0.991	1.022	1.107	1.116	1.122	1.229	1.258	1.248
4.000	0.537	0.529	0.540	1.024	0.974	1.010	1.094	1.105	1.111	1.216	1.240	1.240
4.333	0.535	0.527	0.538	1.010	0.963	0.996	1.086	1.097	1.093	1.208	1.228	1.228
4.667	0.529	0.521	0.532	1.000	0.952	0.986	1.074	1.085	1.081	1.196	1.218	1.218
5.000	0.528	0.520	0.531	0.988	0.940	0.974	1.064	1.075	1.071	1.186	1.210	1.210
5.333	0.521	0.513	0.524	0.977	0.932	0.963	1.056	1.067	1.063	1.178	1.201	1.201
5.667	0.522	0.514	0.525	0.967	0.922	0.953	1.047	1.058	1.054	1.169	1.195	1.196
6.000	0.508	0.500	0.511	0.958	0.915	0.944	1.042	1.052	1.048	1.164	1.187	1.187
6.333	0.488	0.490	0.491	0.948	0.907	0.934	1.033	1.043	1.040	1.155	1.179	1.179
6.667	0.485	0.487	0.488	0.938	0.898	0.925	1.025	1.035	1.032	1.147	1.173	1.173
7.000	0.478	0.480	0.481	0.929	0.890	0.916	1.019	1.029	1.026	1.141	1.165	1.165
7.333	0.485	0.487	0.488	0.922	0.884	0.909	1.011	1.021	1.018	1.133	1.160	1.157
7.667	0.487	0.489	0.490	0.914	0.878	0.901	1.003	1.016	1.013	1.125	1.154	1.150
8.000	0.488	0.490	0.491	0.907	0.869	0.894	0.997	1.010	1.007	1.119	1.149	1.145
8.333	0.473	0.477	0.476	0.900	0.864	0.887	0.992	1.005	1.002	1.114	1.142	1.140
8.667	0.464	0.468	0.467	0.894	0.859	0.881	0.987	1.000	0.995	1.109	1.136	1.134
9.000	0.465	0.469	0.468	0.885	0.854	0.873	0.981	0.994	0.989	1.103	1.132	1.129
9.333	0.463	0.467	0.466	0.880	0.849	0.868	0.976	0.990	0.985	1.098	1.126	1.125
9.667	0.458	0.465	0.465	0.872	0.845	0.860	0.972	0.984	0.979	1.094	1.124	1.122
10.000	0.461	0.465	0.464	0.869	0.843	0.858	0.969	0.981	0.977	1.091	1.118	1.122
10.333	0.460	0.463	0.462	0.867	0.842	0.858	0.968	0.979	0.976	1.089	1.117	1.122
10.667	0.459	0.463	0.461	0.866	0.842	0.857	0.967	0.978	0.976	1.087	1.117	1.122
11.000	0.459	0.462	0.461	0.866	0.841	0.857	0.967	0.978	0.975	1.086	1.116	1.121
11.333	0.458	0.462	0.461	0.865	0.842	0.856	0.966	0.978	0.975	1.086	1.116	1.121
11.667	0.458	0.462	0.461	0.866	0.842	0.856	0.966	0.977	0.975	1.085	1.116	1.121
12.000	0.458	0.462	0.461	0.866	0.842	0.856	0.966	0.977	0.975	1.085	1.116	1.121
12.333	0.458	0.462	0.461	0.866	0.842	0.856	0.966	0.977	0.975	1.085	1.116	1.121
12.667	0.458	0.462	0.461	0.866	0.842	0.856	0.966	0.977	0.975	1.085	1.116	1.121
13.000	0.458	0.462	0.461	0.866	0.842	0.856	0.966	0.977	0.974	1.085	1.116	1.121

TABLA 3. Valores de absorbancia vs tiempo, obtenidos al monitorear la concentración de DPPH frente al extracto concentrado al vacío a diferentes concentraciones.

La cantidad de gramos de sólidos esta dada por cada 1000 mg de DPPH												
Tiempo(min)	5400 mg sólidos			3780 mg sólidos			3420 mg sólidos			3060 mg sólidos		
0.000	1.809	1.808	1.810	1.799	1.798	1.798	1.810	1.809	1.807	1.800	1.810	1.808
0.333	1.254	1.263	1.270	1.355	1.359	1.345	1.384	1.383	1.381	1.468	1.478	1.476
0.667	1.186	1.195	1.202	1.322	1.315	1.306	1.328	1.327	1.325	1.432	1.442	1.440
1.000	1.144	1.153	1.160	1.283	1.282	1.271	1.304	1.304	1.303	1.411	1.421	1.419
1.333	1.113	1.122	1.129	1.250	1.255	1.242	1.281	1.281	1.284	1.394	1.404	1.400
1.667	1.087	1.096	1.099	1.223	1.236	1.215	1.255	1.255	1.258	1.379	1.389	1.385
2.000	1.064	1.073	1.076	1.204	1.209	1.196	1.234	1.234	1.237	1.362	1.374	1.370
2.333	1.043	1.052	1.055	1.187	1.190	1.173	1.215	1.215	1.218	1.350	1.362	1.358
2.667	1.022	1.031	1.034	1.168	1.173	1.154	1.200	1.200	1.203	1.346	1.358	1.354
3.000	1.005	1.014	1.017	1.153	1.154	1.139	1.181	1.185	1.188	1.337	1.349	1.345
3.333	0.986	0.995	0.998	1.128	1.139	1.123	1.164	1.169	1.172	1.323	1.335	1.331
3.667	0.969	0.978	0.981	1.113	1.123	1.108	1.152	1.157	1.161	1.318	1.330	1.326
4.000	0.953	0.961	0.964	1.099	1.108	1.094	1.140	1.145	1.149	1.308	1.320	1.316
4.333	0.938	0.944	0.947	1.079	1.094	1.079	1.128	1.133	1.137	1.296	1.308	1.302
4.667	0.924	0.930	0.933	1.067	1.079	1.061	1.123	1.128	1.132	1.279	1.291	1.285
5.000	0.910	0.916	0.919	1.053	1.067	1.047	1.106	1.111	1.115	1.273	1.285	1.279
5.333	0.897	0.903	0.906	1.042	1.053	1.036	1.098	1.103	1.107	1.266	1.279	1.273
5.667	0.884	0.890	0.893	1.030	1.042	1.025	1.087	1.092	1.096	1.262	1.275	1.269
6.000	0.873	0.879	0.882	1.020	1.031	1.015	1.079	1.084	1.087	1.256	1.269	1.263
6.333	0.860	0.866	0.869	1.011	1.021	1.006	1.073	1.078	1.081	1.251	1.264	1.258
6.667	0.851	0.857	0.860	0.999	1.012	0.994	1.061	1.065	1.068	1.242	1.255	1.249
7.000	0.839	0.845	0.855	0.991	1.000	0.986	1.055	1.059	1.062	1.236	1.249	1.245
7.333	0.829	0.835	0.845	0.983	0.992	0.978	1.045	1.049	1.052	1.230	1.243	1.239
7.667	0.820	0.826	0.836	0.973	0.984	0.968	1.038	1.042	1.045	1.223	1.236	1.232
8.000	0.812	0.818	0.828	0.965	0.974	0.960	1.031	1.035	1.038	1.218	1.231	1.227
8.333	0.801	0.807	0.817	0.957	0.966	0.953	1.021	1.025	1.028	1.213	1.225	1.221
8.667	0.793	0.799	0.809	0.951	0.959	0.947	1.014	1.018	1.021	1.209	1.221	1.217
9.000	0.783	0.789	0.799	0.945	0.953	0.941	1.008	1.012	1.015	1.202	1.214	1.210
9.333	0.776	0.782	0.792	0.938	0.947	0.934	1.003	1.007	1.010	1.198	1.210	1.206
9.667	0.773	0.779	0.789	0.932	0.940	0.928	0.996	1.000	1.003	1.192	1.204	1.200
10.000	0.772	0.775	0.787	0.932	0.938	0.928	0.993	0.996	0.999	1.190	1.202	1.198
10.333	0.772	0.773	0.785	0.932	0.937	0.928	0.991	0.994	0.997	1.188	1.200	1.197
10.667	0.772	0.772	0.784	0.932	0.937	0.928	0.990	0.992	0.995	1.187	1.199	1.197
11.000	0.771	0.771	0.784	0.932	0.936	0.927	0.990	0.991	0.994	1.185	1.197	1.196
11.333	0.772	0.771	0.783	0.932	0.936	0.927	0.989	0.990	0.993	1.185	1.197	1.197
11.667	0.772	0.771	0.783	0.932	0.936	0.927	0.989	0.990	0.993	1.185	1.196	1.197
12.000	0.772	0.771	0.783	0.932	0.936	0.927	0.989	0.990	0.993	1.186	1.196	1.197
12.333	0.772	0.771	0.783	0.932	0.936	0.927	0.989	0.990	0.993	1.185	1.196	1.197
12.667	0.772	0.771	0.783	0.932	0.936	0.927	0.989	0.990	0.993	1.185	1.196	1.197
13.000	0.772	0.771	0.783	0.932	0.936	0.927	0.989	0.990	0.993	1.185	1.196	1.197

TABLA 4. Valores de absorbancia vs tiempo, obtenidos al monitorear la concentración de DPPH frente al extracto concentrado por horno a diferentes concentraciones.

Tiempo(min)	La cantidad de gramos de sólidos esta dada por cada 1000 mg de DPPH											
	18000 mg sólidos			10800 mg sólidos			7200 mg sólidos			3600 mg sólidos		
0.000	1.799	1.798	1.798	1.783	1.782	1.785	1.801	1.798	1.792	1.799	1.799	1.797
0.333	1.328	1.325	1.323	1.513	1.509	1.514	1.489	1.479	1.471	1.575	1.578	1.580
0.667	1.182	1.179	1.178	1.367	1.363	1.368	1.376	1.369	1.361	1.518	1.522	1.526
1.000	1.093	1.093	1.089	1.278	1.277	1.282	1.312	1.303	1.297	1.475	1.487	1.491
1.333	1.033	1.033	1.019	1.218	1.217	1.222	1.262	1.260	1.253	1.450	1.462	1.465
1.667	0.990	0.992	0.976	1.175	1.176	1.181	1.225	1.222	1.217	1.430	1.442	1.445
2.000	0.953	0.955	0.937	1.138	1.139	1.144	1.194	1.190	1.186	1.403	1.415	1.418
2.333	0.914	0.918	0.900	1.099	1.102	1.107	1.168	1.166	1.160	1.401	1.413	1.415
2.667	0.894	0.898	0.880	1.079	1.082	1.087	1.145	1.144	1.140	1.389	1.401	1.403
3.000	0.870	0.874	0.855	1.055	1.058	1.063	1.127	1.125	1.122	1.377	1.389	1.391
3.333	0.850	0.854	0.835	1.035	1.038	1.043	1.109	1.107	1.106	1.367	1.379	1.371
3.667	0.830	0.834	0.795	1.015	1.018	1.023	1.094	1.094	1.092	1.358	1.370	1.362
4.000	0.817	0.821	0.783	1.002	1.005	1.010	1.078	1.077	1.078	1.348	1.360	1.352
4.333	0.796	0.800	0.762	0.981	0.984	0.989	1.065	1.064	1.066	1.338	1.350	1.341
4.667	0.781	0.785	0.747	0.966	0.969	0.974	1.052	1.052	1.054	1.330	1.342	1.333
5.000	0.769	0.773	0.735	0.954	0.957	0.962	1.040	1.041	1.043	1.324	1.336	1.327
5.333	0.757	0.761	0.722	0.942	0.945	0.950	1.028	1.030	1.033	1.318	1.330	1.321
5.667	0.743	0.747	0.708	0.928	0.931	0.936	1.016	1.025	1.031	1.311	1.323	1.314
6.000	0.732	0.736	0.697	0.917	0.920	0.925	1.007	1.014	1.021	1.305	1.317	1.308
6.333	0.720	0.724	0.685	0.905	0.908	0.913	0.998	1.002	1.008	1.299	1.311	1.301
6.667	0.709	0.713	0.673	0.894	0.897	0.902	0.989	0.991	0.999	1.292	1.304	1.294
7.000	0.699	0.703	0.663	0.884	0.887	0.892	0.979	0.983	0.990	1.286	1.298	1.288
7.333	0.695	0.699	0.659	0.880	0.883	0.888	0.971	0.975	0.982	1.281	1.293	1.283
7.667	0.687	0.691	0.652	0.872	0.875	0.880	0.962	0.968	0.975	1.275	1.287	1.277
8.000	0.682	0.686	0.647	0.866	0.870	0.875	0.955	0.958	0.967	1.271	1.283	1.272
8.333	0.671	0.675	0.636	0.857	0.859	0.864	0.947	0.953	0.960	1.267	1.279	1.268
8.667	0.660	0.664	0.626	0.846	0.848	0.853	0.941	0.946	0.953	1.264	1.276	1.265
9.000	0.656	0.660	0.622	0.842	0.844	0.849	0.934	0.939	0.947	1.260	1.272	1.261
9.333	0.646	0.650	0.602	0.832	0.834	0.839	0.928	0.934	0.939	1.257	1.269	1.258
9.667	0.643	0.647	0.599	0.829	0.831	0.836	0.922	0.929	0.934	1.253	1.265	1.254
10.000	0.635	0.639	0.591	0.821	0.823	0.828	0.916	0.924	0.927	1.249	1.261	1.250
10.333	0.628	0.633	0.585	0.815	0.817	0.821	0.913	0.919	0.922	1.245	1.257	1.246
10.667	0.622	0.627	0.580	0.810	0.811	0.815	0.910	0.915	0.917	1.242	1.253	1.242
11.000	0.616	0.623	0.576	0.806	0.808	0.810	0.908	0.912	0.915	1.239	1.250	1.239
11.333	0.611	0.619	0.573	0.802	0.804	0.806	0.906	0.910	0.913	1.237	1.247	1.236
11.667	0.608	0.616	0.571	0.799	0.801	0.805	0.905	0.909	0.911	1.236	1.245	1.234
12.000	0.607	0.615	0.570	0.798	0.800	0.804	0.904	0.909	0.910	1.236	1.244	1.235
12.333	0.606	0.614	0.570	0.797	0.799	0.804	0.904	0.909	0.910	1.235	1.244	1.235
12.667	0.606	0.613	0.570	0.797	0.799	0.804	0.904	0.909	0.910	1.235	1.244	1.235
13.000	0.606	0.613	0.570	0.797	0.799	0.804	0.904	0.909	0.910	1.235	1.244	1.235

TABLA 5. Datos de eficiencia antioxidante

Parámetros para el cálculo de la eficiencia antioxidante con sus réplicas			
	EC ₅₀	T _{EC50}	EA
LE	2916.55	11.30	3.03426E-05
	2904.01	11.80	2.91823E-05
	2887.08	12.30	2.81602E-05
FD	3531.48	10.30	2.74920E-05
	3383.42	10.30	2.86950E-05
	3384.26	9.70	3.04625E-05
VE	3997.20	10.00	2.50175E-05
	4005.72	10.30	2.42372E-05
	3937.50	9.90	2.56534E-05
CO	7843.66	12.90	9.88306E-06
	8160.46	12.30	9.96277E-06
	8366.29	11.30	1.05776E-05

TABLA 6. Contenido de vitamina C obtenidos por HPLC

Contenido de vitamina C en los diferentes extractos			
LE	FD	VE	CO
59.29	51.12	45.19	22.79
59.03	48.98	45.29	23.71
58.69	48.99	44.52	24.31

TABLA 7. Datos cinéticos de la reacción entre DPPH y antioxidantes contenidos en el extracto de *Moringa* para la determinación de la constante de velocidad k_2

Tiempo (s)	Concentraciones expresadas en mg/mL											
	0.2300			0.1370			0.0920			0.0462		
0	1.792	1.791	1.791	1.801	1.802	1.801	1.801	1.800	1.801	1.805	1.804	1.806
30	1.005	1.006	1.004	1.203	1.202	1.201	1.384	1.385	1.383	1.678	1.679	1.678
60	0.76	0.761	1.758	0.944	0.945	0.943	1.172	1.171	1.172	1.602	1.601	1.601
90	0.653	0.652	0.65	0.813	0.814	0.812	1.060	1.059	1.058	1.555	1.553	1.556
120	0.613	0.614	0.612	0.736	0.735	0.736	0.981	0.983	0.984	1.515	1.514	1.516
150	0.587	0.586	0.588	0.687	0.686	0.688	0.925	0.924	0.925	1.487	1.489	1.488
180	0.578	0.577	0.577	0.653	0.651	0.654	0.880	0.880	0.879	1.478	1.475	1.480
210	0.571	0.57	0.571	0.629	0.630	0.628	0.843	0.842	0.844	1.451	1.450	1.449
240	0.566	0.564	0.565	0.614	0.613	0.614	0.811	0.813	0.810	1.435	1.434	1.433
270	0.562	0.563	0.561	0.599	0.600	0.598	0.772	0.771	0.774	1.424	1.425	1.424
300	0.561	0.558	0.56	0.590	0.589	0.590	0.758	0.758	0.759	1.408	1.407	1.406
330	0.557	0.558	0.557	0.582	0.581	0.583	0.744	0.743	0.740	1.394	1.393	1.395
360	0.556	0.555	0.556	0.576	0.576	0.577	0.722	0.722	0.720	1.378	1.378	1.377
390	0.553	0.553	0.554	0.584	0.584	0.585	0.702	0.703	0.701	1.368	1.366	1.367
420	0.552	0.552	0.552	0.575	0.576	0.575	0.687	0.685	0.686	1.355	1.356	1.356
450	0.551	0.55	0.551	0.570	0.569	0.570	0.672	0.673	0.671	1.335	1.333	1.334
480	0.549	0.548	0.548	0.563	0.562	0.564	0.659	0.661	0.662	1.331	1.332	1.332
510	0.547	0.548	0.548	0.558	0.560	0.560	0.648	0.649	0.651	1.318	1.319	1.319
540	0.548	0.547	0.547	0.555	0.554	0.557	0.636	0.636	0.637	1.300	1.299	1.299
570	0.548	0.547	0.548	0.553	0.552	0.551	0.626	0.626	0.627	1.295	1.295	1.295
600	0.548	0.547	0.547	0.550	0.550	0.549	0.617	0.616	0.615	1.283	1.283	1.284

Apéndice 3

Equipos usados en los experimentos

Equipo usado en la lixiviación

- Shaking water bath



Equipos usados en el secado

- Horno o secador de bandejas.



- Liofilizador.



- Sistema de secado al vacío usando rotavapor



Equipos usados para la realización de los análisis.

- Espectrofotómetro UV



- Sistema HPLC.



Apéndice 4

Fotos de experimentos

Pesado de las hojas



Lixiviación de las hojas



Extracto de las hojas después del lixiviado



Destilación del alcohol antes del liofilizado



Pesado del DPPH



DPPH concentrado a 0.025 g/l



Cambio de color de la solución de DPPH debido a la reacción de reducción al entrar en contacto con un antioxidante (Vitamina C).



Extracto liofilizado



Extracto secado por horno

