



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Área de Fisiología Vegetal

Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* de diferente origen geográfico

Estudo sobre a capacidade antioxidante de extractos de folla de *Moringa oleifera* de diferente orixen xeográfico

Study about antioxidant capacity of leave extract of *Moringa oleifera* from different geographic origin



Rafael García Hernández

Trabajo de Fin de Grado

Fecha de Defensa: 19 de Septiembre de 2017

Dirigido por la Dra. María de los Ángeles Bernal Pita Veiga

Facultad de Ciencias

TRABALLO FIN DE GRAO

Dña. María de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao "Estudo sobre a capacidade antioxidante de extractos de folla de *Moringa oleifera* de diferente orixe xeográfico", presentado por Rafael Alberto García Hernández para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 11 de Setembro del 2017.

Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. La <i>Moringa</i>	1
1.2. Compuestos fenólicos	3
1.3. Capacidad antioxidante.....	3
1.4. Proyecto con <i>Moringa</i> y la ONG “Miradas al Mundo”	6
2. Objetivos.....	7
3. Material y métodos	8
3.1. Material vegetal.....	8
3.2. Reactivos	9
3.3. Análisis elemental	10
3.4. Extracción de compuestos fenólicos	10
3.4.1. Métodos de extracción.....	10
3.4.2. Determinación del contenido de fenoles totales	10
3.5. Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo DPPH.....	11
3.5.1. Recta patrón de Trolox	11
3.5.2. Recta patrón de Quercetina.....	11
3.6. Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo ABTS.....	12
3.6.1. Recta patrón de Trolox	12
3.6.2. Recta patrón de Quercetina.....	12
3.7. Diferentes modos de medir la absorbancia en nuestros métodos.....	13
3.8. Análisis estadístico.....	13
4. Resultados y discusión	13
4.1. Análisis elemental	13
4.2. Determinación del contenido de fenoles totales	14
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante.....	15
4.3.1. Ensayo con DPPH	17
4.3.2. Ensayo con ABTS.....	18
4.3.3. Relación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante	20
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía.....	22

Resumen

En nuestro estudio, se buscó comparar la capacidad antioxidante del polvo de hoja de *Moringa oleifera* Lam. de diferentes orígenes geográficos (Galicia y Guinea). Además, se estudió la relación entre la capacidad antioxidante de cada muestra y su cantidad de compuestos fenólicos.

El contenido en fenoles totales fue medido por el método Folin-Ciocalteu mientras que la actividad antioxidante se midió mediante dos ensayos espectrofotométricos de actividad antioxidante (DPPH y ABTS). Además, hemos comparado tres solventes diferentes a la hora de extraer los compuestos fenólicos: metanol 80%, acetonitrilo 70% con ácido acético al 4% y agua destilada.

Los resultados demostraron que hay una alta relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante y que el solvente que mejor los extrae es el agua destilada. Así mismo, hemos puesto en evidencia que las hojas cultivadas en Galicia poseen un mayor contenido en fenoles que las de Guinea y, por lo tanto, una mayor capacidad antioxidante.

Abstract

In our study, we have sought the antioxidant capacity of *Moringa oleifera* Lam. leaf powder of different geographical origins (Galicia and Guinea). In addition, the relationship between the antioxidant capacity of each sample and its amounts of phenolic compounds was studied.

The total phenol content was measured by the Folin-Ciocalteu method when the antioxidant activity was measured by two spectrophotometric assays of antioxidant activity (DPPH and ABTS). In addition, we compared three different solvents when extracting phenolic compounds: 80% methanol, 70% acetonitrile with 4% acetic acid and distilled water.

The results showed that there is a high ratio between the phenolic compounds and the antioxidant activity and that the solvent that extracts them the best is distilled water. Likewise, we found that the leaves grown in Galicia have a higher content of phenols than those of Guinea and, therefore, a greater antioxidant capacity.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, DPPH, ABTS.

Keywords: *Moringa oleifera*, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH, ABTS.

1. Introducción

1.1. La *Moringa*

Moringa oleifera Lam. también conocida como el árbol de la vida o “the drumstick tree”, es una especie de la familia *Moringaceae* procedente del sur de Asia. Es un árbol originario del sur del Himalaya, y nativa del noreste de India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán, aunque se encuentra diseminado en gran parte del planeta (Figura 1) (Pérez et al., 2010).

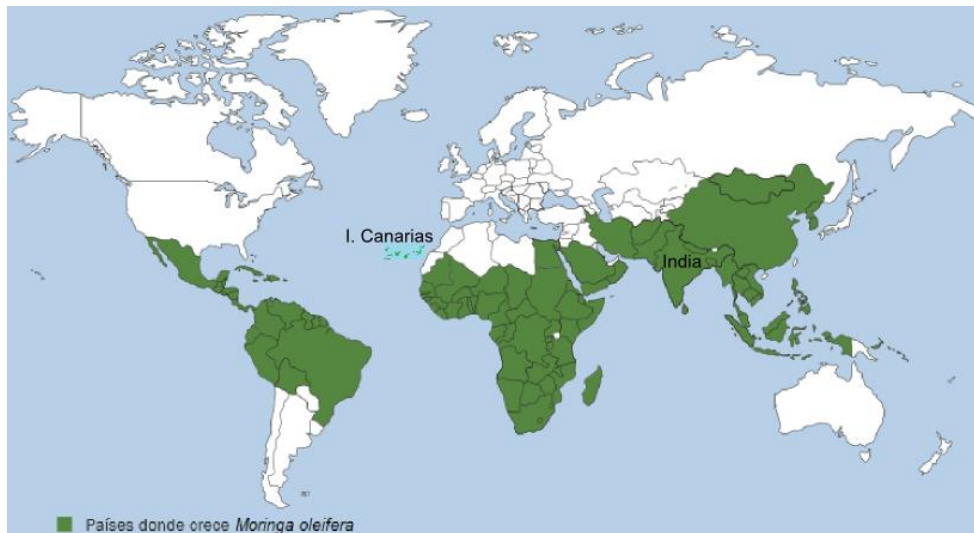


Figura 1: Distribución mundial de la especie *M. oleifera* (Fuente: <http://agriculturasiempre.blogspot.com.es/2013/11/cultivo-y-usos-potenciales-de-la.html>).

Es un árbol caduco que crece rápidamente en suelos pobres, se adapta bien a las sequías y es capaz de alcanzar hasta 15m de altura, con un diámetro de 20 a 40 cm a la altura del pecho. Las hojas son compuestas (Figura 2) y están dispuestas en grupos de folíolos, con cinco pares de estos acomodados sobre el pecíolo principal y un folíolo en la parte terminal. Las hojas son alternas tripinnadas, con una longitud de 30-70 cm. (Pérez et al., 2010)



Figura 2: Tallo y hojas de *M. oleifera* del invernadero de la UDC.

Moringa oleifera es una de las 13 especies del género *Moringa*. Se identifica por el fruto en forma de vaina larga y leñosa que al madurar se abre en tres valvas, y contiene las semillas trivalvas con alas longitudinales (Figura 3) (Velázquez-Zavala et al., 2016), que hacen que la dispersión por el viento sea más fácil (Ferreira et al., 2008). Las flores (Figura 4) son zigomorfas con cinco pétalos, cinco sépalos, cinco estambres funcionales y varios estaminodios; tienen pedicelos e inflorescencias axilares. La planta posee tallos erectos y raíces tuberosas (Velázquez-Zavala et al., 2016).

La *Moringa* es una planta con un elevado interés tanto nutricional como comercial. En ella se han identificado una alta cantidad de proteínas, fibra, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, minerales, metabolitos secundarios (carotenos y tocoferoles) y algunos metabolitos minoritarios (Velázquez-Zavala et al., 2016).



Figura 3: Semillas de *M. oleifera* (Fuente: <https://dir.indiamart.com/hyderabad/moringa-seeds.html>).

Figura 4: Flores de *M. oleifera* (Fuente: <http://lagarrafa.blogspot.com.es/2010/10/la-moringa-regalo-de-dios-para-vivir.html>).

Todas las partes de la planta son comestibles (Förster et al., 2015) y tiene una gran cantidad de aplicaciones: usos medicinales, tratamiento de agua, biocombustibles, forrajero...

Debido a todos estos factores la planta es usada en muchos países para tratar la desnutrición tanto que la planta ha sido recomendada por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para complementar la dieta (Velázquez-Zavala et al., 2016). Las hojas son usadas como suplemento nutricional ya que contiene una cantidad significativa de vitamina A, B y C además de Ca^{2+} , Fe y proteínas (Ferreira et al., 2008).

Además, las zonas en las que se localiza actualmente la planta coinciden con las zonas en las que la desnutrición afecta especialmente, siendo muy apropiado por su potencial como recurso agronómico local (Navarro, 2015). Esto junto a su resistencia a la sequía y su elevado nivel nutricional la convierten en un recurso óptimo para combatir el hambre.

1.2. Compuestos fenólicos

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios, entre ellos están los compuestos fenólicos que se caracterizan por contener un grupo fenol y un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático (Figura 5).

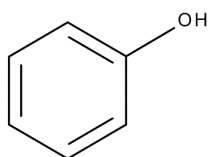


Figura 5: Compuesto fenólico simple (Fuente: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m63520.html).

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10.000 compuestos. Algunos son solubles solo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles (Taiz & Zieger, 2006). Los grupos hidroxilo de los fenoles son ácidos en comparación a otros grupos hidroxilo debido a que están en un anillo, lo cual les permite estabilizar inmediatamente un sustituyente oxigenado desprotonado (Buchanan et al., 2015) es decir, son capaces de donar el átomo de hidrógeno de su grupo fenol a los radicales libres, deteniendo el paso de propagación de la cadena durante el proceso de oxidación (Teixeira et al., 2013).

Los compuestos fenólicos son esenciales en la dieta humana y poseen un interés considerable debido a sus propiedades antioxidantes. Naturalmente los antioxidantes tienen la habilidad de prevenir el daño en los tejidos evitando la formación de radicales libres, eliminándolos y promoviendo su descomposición (Peña-Cerda et al., 2017)

Los componentes fenólicos presentes en *M. oleifera* pueden reducir el riesgo de muchas enfermedades y sus efectos están correlacionados con su capacidad antioxidante. Las hojas de *Moringa* que tienen un alto contenido en compuestos fenólicos como flavonoides, ácido gálico, quercetina y kaempferol (Fitriana et al., 2016; Siddhuraju & Becker, 2003).

1.3. Capacidad antioxidante.

Un antioxidante es cualquier sustancia que en presencia de un sustrato oxidable retrasa o inhibe la formación del mismo. Se caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles, localizarse intra o extracelularmente y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes o proceden de estos y otros son productos del metabolismo (Agudo, 2012).

Tanto en el metabolismo normal de la planta como cuando aparecen situaciones de estrés, se generan radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) como pueden ser los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido ($\cdot\text{O}^-_2$). A bajas concentraciones los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células (Agudo, 2012). No obstante, un exceso puede provocar daños en la planta. Cuando esto ocurre la planta sintetiza antioxidantes

como los compuestos fenólicos, ya que poseen capacidad de hacer frente a los radicales libres generados por el metabolismo.

Los radicales libres y ROS son bien conocidas como inductoras de la patogénesis de células y tejidos causando multitud de enfermedades. Estas son constantemente producidas por el cuerpo humano debido a la actividad metabólica y una sobreproducción de las mismas puede crear un desbalance del sistema defensivo (Fitriana et al., 2016). Los antioxidantes tienen la habilidad de eliminar esos radicales libres (Wang et al., 2016).

Los antioxidantes naturales, particularmente los que están presentes en frutas y vegetales, han ganado un creciente interés por parte de los consumidores y la comunidad científica ya que los estudios epidemiológicos han indicado que la ingesta frecuente de estos está asociado a un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Thaipong et al., 2006). Además, el interés en fuentes naturales de antioxidantes está creciendo mucho más rápido que el de las fuentes sintéticas (Fitriana et al., 2016).

Para estudiar la actividad antioxidante hemos realizado dos ensayos espectrofotométricos de decoloración en los que un compuesto oxidado coloreado se reduce frente a las capacidades antioxidantes de nuestros extractos. Ambos los referimos a dos estándares antioxidantes (Trolox y quercetina) para poder validar los datos en función del número de radicales hidroxilo (Castro, 2016).

En nuestro experimento elegimos los ensayos del DPPH y el ABTS. Ambos compuestos son radicales libres relativamente estables que han sido usados ampliamente para ensayar la habilidad de determinados compuestos para actuar como eliminadores de radicales libres o bien como donadores de hidrógeno (Fitriana et al. 2016).

❖ Ensayo del DPPH

En el ensayo del DPPH, la actividad antioxidante se determina por un descenso la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de extracto de la planta a estudiar, usando la solución del radical DPPH como blanco (Castro, 2016).

Los componentes con capacidad de eliminar radicales libres tienen la habilidad de reducir el radical libre DPPH donándole un átomo de hidrógeno. La interacción del compuesto antioxidante con el DPPH se basa en la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno al radical DPPH que se convierte en el 1-1, difenil-2-picrylhidrazil (Fitriana et al., 2016).

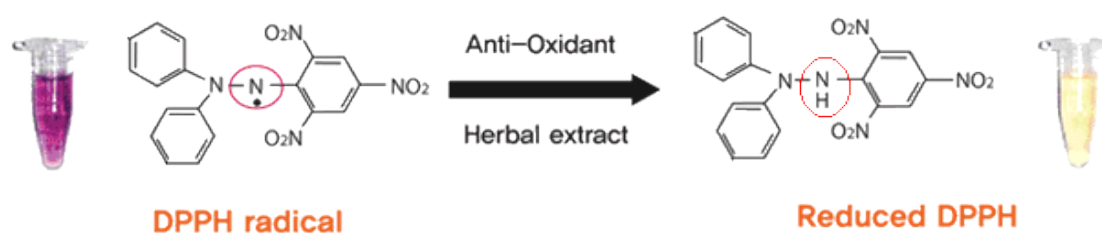


Figura 6: Reacción de reducción del radical DPPH (Fuente: <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>).

El resultado de la reducción de los radicales de DPPH causa la decoloración del color violeta a un amarillo pálido, lo que indica la actividad de eliminación (Fitriana et al., 2016) tal y como podemos observar en la Figura 6.

❖ Ensayo del ABTS

El ensayo del ABTS nos da una medida de la actividad antioxidante de los fenoles, valorando la decoloración del ABTS oxidado, mediante la medida de la reducción del radical catiónico como porcentaje de inhibición de la absorbancia a 724 nm (Re et al., 1998).

El radical $ABTS^{+\bullet}$ se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azino bis (3-etilbenzotiazolín) -6- sulfónico (ABTS) (Figura 7). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde - azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible (Agudo, 2012).

La reducción del ABTS verde/azulado es medida en el espectro a una longitud de onda de 734 nm. Durante esta reducción el ABTS oxidado de color verde pasa a su forma neutra incolora (Fitriana et al., 2016).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos es cuantificada según la cantidad de los radicales de ABTS y DPPH que son capaces de reaccionar con el antioxidante y son expresados como equivalentes de Trolox (TE) y quercetina (QE) para la capacidad antioxidante (Van den Berg et al., 2000).

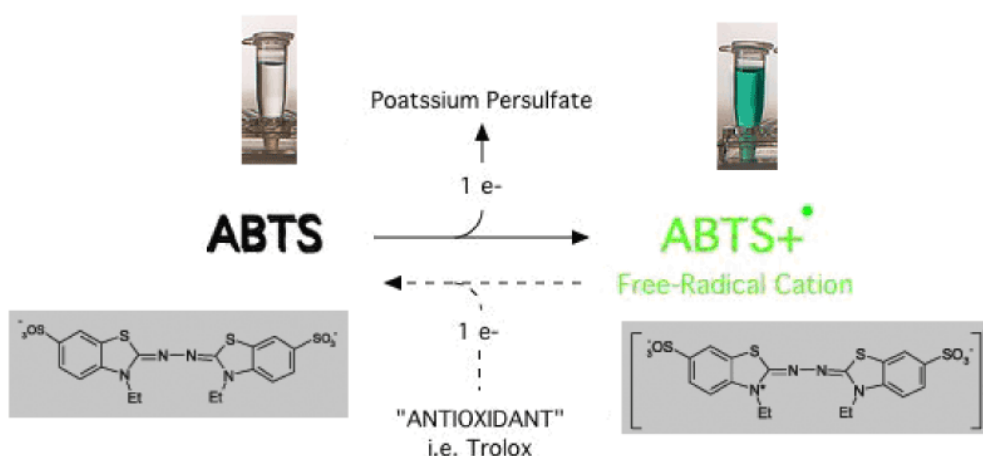


Figura 7: Reacción de oxidación - reducción del ABTS (Boligon et al., 2014).

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) (Re et al., 1998) (Figura 8) es un compuesto antioxidante que es análogo de la vitamina E (Teixeira., 2013) con la solubilidad en el agua potenciada (Fogliano et al., 1999). Utilizaremos este compuesto como estándar para determinar la actividad

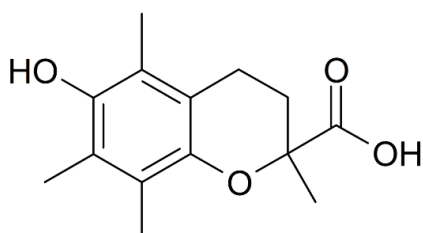


Figura 8: Molécula de Trolox (Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Trolox>).

antioxidante de los fenoles simples de nuestras muestras en los ensayos de medida de la actividad antioxidante.

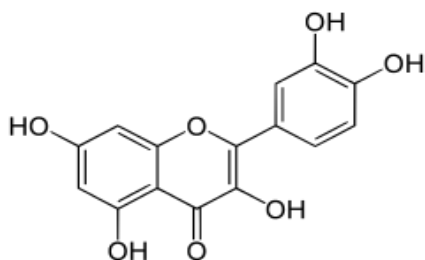


Figura 9: Molécula de quercetina (Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Quercetina>).

La quercetina (Figura 9) es un flavonoide de elevada capacidad antioxidante que usaremos como estándar para medir la actividad antioxidante de los fenoles complejos de nuestra muestra.

1.4. Proyecto con *Moringa* y la ONG “Miradas al Mundo”

La *Moringa* se presenta como una planta con un alto potencial biotecnológico debido a su composición química y por lo tanto con importantes aplicaciones en el estudio de la nutrición infantil, en su uso como biofortificante y en su aplicación como factor fungitóxico y antimicrobiano.

El interés de nuestro trabajo es el de comparar el polvo de hoja de *Moringa* procedente de Guinea Bissau, con el que obtenemos de las plantas cultivadas en el invernadero de la Universidad de A Coruña (Galicia). Guinea Bissau es uno de los focos mundiales de desnutrición infantil y actualmente, la ONG “Miradas al Mundo” desarrolla un proyecto de implementación del uso de *Moringa* como complemento nutricional esa zona.



Figura 10: Localización de Guinea Bissau (Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Guinea-Bisáu>).



Figura 11: Localización de la UDC (Fuente: <https://evaballarín.wordpress.com>).

2. Objetivos

En este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- a) Determinación de la composición del polvo de *Moringa oleifera* de diferente origen mediante análisis elemental.
- b) Puesta a punto de un método de extracción de compuestos fenólicos utilizando tres solventes diferentes: metanol 80%, acetonitrilo 70% con ácido acético 4% y agua destilada.
- c) Análisis del contenido en fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.
- d) Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS utilizando dos patrones: Trolox y Quercetina.
- e) Analizar la posible relación entre compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal

Para nuestro experimento usamos hojas de planta de *Moringa* deshidratadas provenientes de dos orígenes diferentes:

❖ **Planta de *Moringa* de la UDC:**

Cultivada en el invernadero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña, Galicia (Figura 12).

Las hojas se secan en estufa a 70°C durante 48h. A continuación, las trituramos y machacamos hasta obtener un fino polvo a partir del cual realizamos la extracción de los fenoles.



Figura 12: Plantas de *Moringa* del invernadero de la UDC.

❖ **Hojas de *Moringa* de Guinea Bissau:**

El polvo de hoja de *Moringa* procede del poblado de Varela (Guinea Bissau) y fue proporcionado por la ONG “Miradas al mundo”.

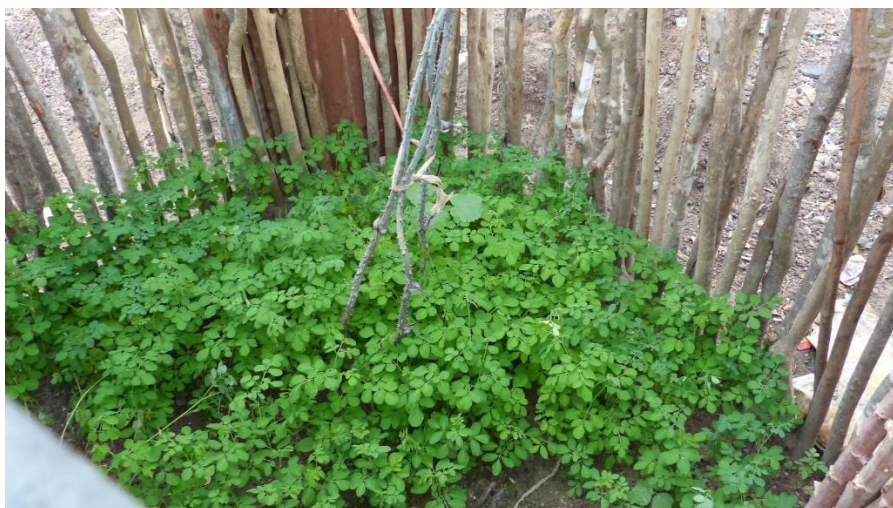


Figura 13: Plantas de *Moringa* de Guinea (Fuente: <http://ongmiradasalmundo.blogspot.com.es>).

3.2. Reactivos

Los reactivos utilizados para medir la cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante, así como su preparación aparecen reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1: Tabla de elaboración de reactivos.

Reactivo	Cantidad de reactivo	Disolvente	Volumen Final
Disolventes			
Metanol 80%	80 ml	20 ml H ₂ O	100 ml
Etanol 70%	70 ml	30 ml H ₂ O	100 ml
Acetonitrilo 70% con ácido acético al 4%	70ml acetonitrilo + 4ml de Ac. Acético	100 ml H ₂ O	100 ml
Ácido Gálico	100 mg	100 ml Me(OH) 80%	100 ml
Folin Ciocalteu			
Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10	10 ml	90 ml H ₂ O	100 ml
Na ₂ CO ₃ 7%	7 gr	100 ml H ₂ O	100 ml
Ácido Gálico 100 mg/ml	100 mg	100 ml Me(OH) 80%	100 ml
Actividad antioxidante			
ABTS 2 mM	50 mg de ABTS	100 ml tampón PBS a pH 7,4 + 200µl de persulfato potásico 70Mm	100 ml
DPPH 1 mM	40mg de DPPH	100 ml Me(OH)	100 ml

3.3. Análisis elemental

Se enviaron muestras al SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña) de nuestro polvo de hoja y del de Guinea para la determinación de nitrógeno, carbono, hidrógeno y azufre mediante análisis elemental (combustión).

3.4. Extracción de compuestos fenólicos

3.4.1. Métodos de extracción

Tomamos las hojas secas de *Moringa* y las trituramos y pasamos por el mortero hasta obtener un fino polvo a partir del cual extrajimos los compuestos fenólicos. Ese polvo fue guardado en oscuridad para evitar su fotodegradación.

La extracción se realizó con tres solventes diferentes:

Extracción con metanol al 80%

Siguiendo el método de Díaz et al. (2001), realizamos una extracción 0,1:1 (p/v) en metanol al 80%, seguido de una incubación a 70°C durante 30 minutos.

Extracción con agua destilada

Siguiendo el método de Kraujalyte et al. (2015), realizamos una extracción 0,1:1 en agua destilada hirviendo, seguido de una incubación a T^a ambiente durante 30 minutos.

Extracción con acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4%

Siguiendo el método de Prior et al. (1998), realizamos una extracción 0,1:1 en acetonitrilo al 70% con ácido acético al 4%, seguido de una incubación a T^a ambiente durante 30 minutos.

3.4.2. Determinación del contenido de fenoles totales

Método de Folin-Ciocalteu y recta de calibrado de ácido gálico

La determinación del contenido de fenoles totales se realiza con el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método modificado que reduce el consumo de reactivos (Kraujalyte et al., 2015).

La recta de calibrado se realizó con 5 concentraciones distintas de ácido gálico (0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml y 0,20 mg/ml) a partir de las cuales se tomaron 100 µl por triplicado y se añadió 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 10 veces. Tras 4 minutos de incubación en oscuridad, le añadimos a cada tubo 1 ml de Na₂CO₃ al 7% y 400 µl de agua destilada, volviendo a incubar los tubos durante 90 minutos en oscuridad. Tras la incubación, se procede a la lectura de la absorbancia a 760 nm, utilizando como blanco un tubo con 100 µl de agua destilada en lugar de ácido gálico.

$$\text{Absorbancia } 760\text{nm} = 4,3751 \cdot [\text{equivalentes de ácido gálico}] + 0,0201$$
$$R^2 = 0,9994$$

La cuantificación del contenido fenólico de las muestras de *Moringa* se realizó con el mismo procedimiento que el empleado en la elaboración de la recta de calibrado, sustituyendo el ácido gálico por 100 µl de nuestra muestra, la cual era diluida previamente en caso de ser necesario. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/ g PS).

3.5. Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de las distintas muestras de *Moringa*, en donde la solución del radical DPPH es la absorbancia inicial (A_0) (Thaipong et al., 2006)

El DPPH con el radical oxidado presenta un color inicial morado que a medida que se va reduciendo se torna amarillo. Esta diferencia de color permite cuantificar el porcentaje de DPPH reducido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = ((A_0 - A_m) - A_0) \times 100, \text{ siendo } A_m \text{ la absorbancia de la muestra}$$

Preparamos una solución de DPPH 1 mM (40 mg de DPPH en 100 ml de metanol absoluto), que se diluye con metanol hasta llegar a valores de absorbancia cercanos a 0,800.

Las medidas de absorbancia se realizaron a 515 nm, utilizando metanol absoluto como blanco y haciendo reaccionar, directamente en la cubeta y sin tiempo de incubación, 50 µl del estándar antioxidante con 950 µl de DPPH. Los valores serán expresados comparándolos con equivalentes de dos compuestos patrón.

3.5.1. Recta patrón de Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1mM en etanol absoluto (25 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 µM). Medimos la absorbancia inicial (A_0) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 515 nm, tomando 50 µl de cada concentración y 950 µl de DPPH.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = 0,0922 \cdot [\text{equivalentes de Trolox}] - 1,1270$$
$$R^2 = 0,9848$$

3.5.2. Recta patrón de Quercetina

Preparamos una solución madre de quercetina 1mM en etanol absoluto (30 mg de quercetina en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 µM). Medimos la

absorbancia inicial (A_0) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 515 nm, tomando 50 μ l de cada concentración y 950 μ l de DPPH.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = 0,1028 \cdot [\text{equivalentes de quercetina}] - 0,4290$$
$$R^2 = 0,9507$$

3.6. Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo ABTS

La capacidad antioxidante se determinó por el descenso en la absorbancia a 734 nm de una solución de ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS+•) con distintas muestras de *Moringa*, tomando dicha solución de ABTS como la absorbancia inicial (A_0).

El ABTS con el radical oxidado presenta un color inicial azul verdoso que a medida que se va reduciendo se vuelve incoloro. Esta diferencia de color permite cuantificar el porcentaje de ABTS reducido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ABTS}_{\text{reducido}} = ((A_0 - A_m) - A_0) \times 100, \text{ siendo } A_m \text{ la absorbancia de la muestra}$$

Preparamos una solución de ABTS 7 mM en agua destilada y la hacemos reaccionar con persulfato de potasio 2,45 mM, dejándose durante 12-16 h en oscuridad. Finalmente, esta disolución se disuelve con etanol absoluto hasta obtener una absorbancia próxima a 0,700 (Re et al., 1998)

Las medidas de absorbancia se realizaron a 734 nm, utilizando etanol absoluto como blanco y haciendo reaccionar, directamente en la cubeta y sin tiempo de incubación, 20 μ l del estándar antioxidante con 980 μ l de ABTS. Los valores serán expresados comparándolos con equivalentes de dos compuestos patrón

3.6.1. Recta patrón de Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1mM en etanol absoluto (25 mg de Trolox en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 μ M). Medimos la absorbancia inicial (A_0) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 734 nm, tomando 10 μ l de cada concentración y 990 μ l de ABTS.

$$\% \text{ ABTS}_{\text{reducido}} = 0,0302 \cdot [\text{equivalentes de Trolox}] - 0,1581$$
$$R^2 = 0,9926$$

3.6.2. Recta patrón de Quercetina

Preparamos una solución madre de quercetina 1mM en etanol absoluto (30 mg de quercetina en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 μ M). Medimos la absorbancia inicial (A_0) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 734 nm, tomando 10 μ l de cada concentración y 990 μ l de ABTS.

$$\% \text{ ABTS}_{\text{reducido}} = 0,0413 \cdot [\text{equivalentes de quercetina}] - 0,8017$$

$$R^2 = 0,9877$$

3.7. Diferentes modos de medir la absorbancia en nuestros métodos

En nuestro experimento hemos usado dos modos diferentes de medir la absorbancia de nuestras muestras. En primer lugar, usamos el modo Fixed que mide un valor fijo de absorbancia en la muestra. Por otro lado, utilizamos el modo Rate, que mide la variación de absorbancia de la muestra durante un intervalo de tiempo determinado (1 minuto).

Pusimos a prueba cuál de los dos modos es el más adecuado para medir la capacidad antioxidante.

3.8. Análisis estadístico

El ensayo de determinación de la cantidad de fenoles totales fue llevado a cabo por duplicado para cada solvente y de cada una de las muestras se hicieron 3 réplicas. Los ensayos de capacidad antioxidante se hicieron una única vez para cada solvente, haciéndose 3 réplicas para cada muestra.

Los datos se expresaron con su respectivo error estándar de la media, que se halló mediante un análisis de la desviación estándar. Las regresiones lineales se llevaron a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2016.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis elemental

Con el objeto de conocer la composición elemental de nuestras muestras, enviamos las mismas al S.A.I (Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña) para realizar un análisis elemental.

Tabla 2: Resultados del análisis elemental.

Muestra	Peso (mg)	% N	% C	% H	% S
UDC	2,439	2,69	41,53	5,90	0,31
Guinea	2,535	4,92	43,64	6,34	0,67

Los resultados obtenidos (Tabla 2) muestran que los valores en % de C e H son similares en ambos tipos de polvo, no es así en N y S en donde las diferencias son marcadas. El polvo procedente de Guinea muestra unos valores de N y S entre 2,5 y 3 veces superiores al polvo procedente las hojas de la UDC.

Estas diferencias podrían estar relacionadas, en el caso del nitrógeno, con el grado de fertilización de nuestras muestras respecto a las procedentes de Guinea. En relación al contenido de azufre es muy interesante la diferencia observada, ya que una característica muy típica de las plantas empleadas para la biorremediación de suelos es la elevada cantidad de azufre que poseen debido a sus fitoquelatinas y esto puede ser un punto muy interesante de partida para el uso de la *Moringa* como planta biorremediadora.

4.2. Determinación del contenido de fenoles totales

En nuestros resultados nos encontramos que las hojas que se han cultivado en el invernadero de la UDC tienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos que las hojas procedentes de Guinea, tal y como se puede observar en la Tabla 3 y en la Figura 14.

Tabla 3: Resultados del análisis de la cantidad de compuestos fenólicos.

	Metanol 80%	Acetonitrilo	Agua Destilada
Muestra	mg GAE / g PS	mg GAE / g PS	mg GAE / g PS
UDC	13,851 ± 0,275	24,468 ± 0,315	23,015 ± 0,604
Guinea	10,554 ± 0,410	16,832 ± 0,466	17,966 ± 0,228

Analizando los datos, podemos observar que la cantidad de fenoles extraídos varía en función del solvente utilizado. La mayor cantidad de fenoles la obtuvimos extrayendo con agua destilada y acetonitrilo en el que obtuvimos una mayor capacidad de extracción en las hojas de la UDC. Por último, con el que menor cantidad de fenoles obtuvimos es el metanol.

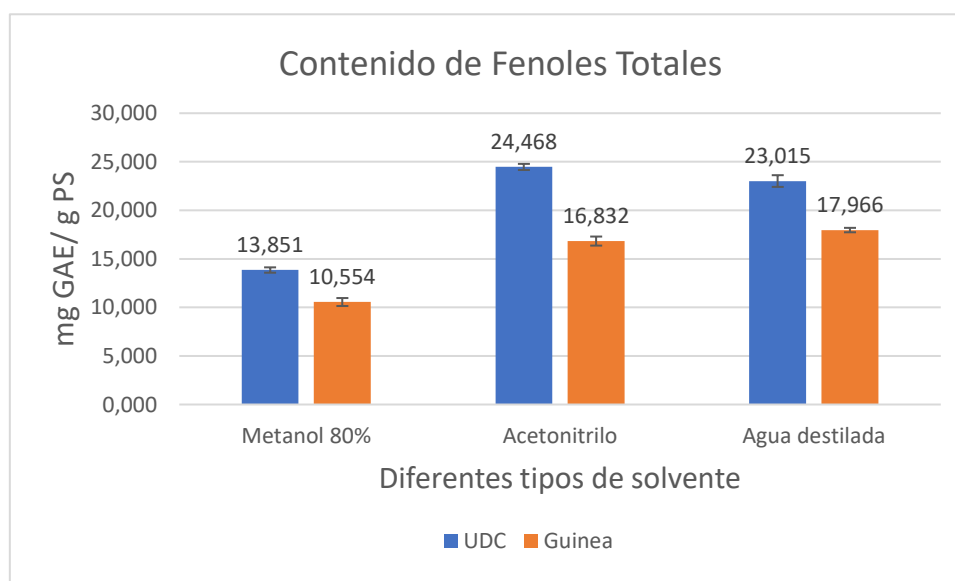


Figura 14: Contenido en fenoles totales de cada variedad de hoja según el solvente.

Los compuestos fenólicos han demostrado propiedades antioxidantes prometedoras, su potencial está directamente relacionado con el tipo de disolvente utilizado para la extracción, pero también con el origen vegetal, las condiciones de cultivo, el tiempo de cosecha y las condiciones de almacenamiento (Martins et al., 2015).

En nuestro caso hay varios motivos que pueden explicar porque el contenido de fenoles del polvo de *Moringa* de la UDC es superior al de Guinea:

- ❖ El contenido de fenoles puede variar entre las diferentes plantas de una misma especie. Las hojas de nuestros ensayos poseen diferentes orígenes geográficos y esto puede hacer variar el contenido en fenoles de nuestras muestras.
- ❖ Las condiciones de cultivo de nuestras plantas son muy diferentes a las de Guinea. La *Moringa* es una planta de secano, acostumbrada a las condiciones de estrés por sequía. El hecho de situarla en un clima con unas condiciones climáticas de alta humedad y precipitaciones además del regado y el uso de fertilizantes pudo provocar que se elevaran los niveles de estrés de la planta y que por tanto se liberaran especies reactivas de oxígeno y radicales libres. En respuesta a esto, pudo haber aumentado la cantidad de compuestos fenólicos para afrontar la situación de estrés hídrico.
- ❖ Tanto la variación en la edad a la que se recolecten las hojas como su estado de desarrollo y la parte de la planta de la que se recolecten (Förster et al., 2015), puede explicar las diferencias entre la cantidad de fenoles de nuestros extractos. Las plantas cuando son jóvenes dedican la mayor parte de su energía a desarrollar metabolitos que ayuden a su crecimiento como fitohormonas (auxinas, giberelinas...) y en su debida concentración algunos metabolitos secundarios (Doberski, 1986) mientras que las plantas que ya han terminado su fase de crecimiento pueden gastar energía en la producción de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos.
- ❖ Las diferencias en el método de secado de las hojas, así como las condiciones de almacenamiento también han podido afectar al contenido de fenoles presentes en nuestros extractos. Mientras que en el laboratorio hemos secado las hojas en la estufa a 70°C durante dos días, el método de secado tradicional es diferente. Las hojas se suelen colocar dentro de una casa para protegerlas del sol y la humedad. Se secan sobre unas bandejas o camillas cubiertas por una fina tela para evitar que se estropeen. También se suelen colgar las hojas enteras sin retirar el foliolo en ramilletes sobre una cuerda garantizando un secado más rápido y reduciendo el riesgo de contraer moho tal y como nos indica en Navarro (2015) en su artículo.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante

En nuestro experimento usamos dos métodos espectrofotométricos distintos para medir la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS). Cada uno de estos

métodos los referimos a dos estándares antioxidantes (Trolox y Quercetina). Realizamos las extracciones de las muestras con tres solventes diferentes.

Además, a la hora de usar en el espectrofotómetro hemos usado dos modos diferentes para medir la absorbancia de nuestras muestras. En primer lugar, usamos el modo Fixed que mide un valor fijo de absorbancia de la muestra. Por otro lado, utilizamos el modo Rate, que mide la variación de absorbancia de la muestra durante un intervalo de tiempo determinado (1 minuto).

Pusimos a prueba cuál de los dos modos es el más adecuado para medir la capacidad antioxidante. Podemos ver los resultados de nuestro experimento en la Tabla 4:

Tabla 4: Capacidad antioxidante del modo Rate frente al modo Fixed.

Muestra	RATE		FIXED	
	μmol TE / g PS	μmol QE / g PS	μmol TE / g PS	μmol QE / g PS
UDC	58,699 ± 0,423	51,289 ± 0,379	108,904 ± 3,130	96,316 ± 2,807
Guinea	34,633 ± 2,785	29,704 ± 2,498	64,837 ± 4,729	56,793 ± 4,242

Como podemos observar en las Figuras 15 y 16, los valores de capacidad antioxidante más elevados se dan con el modo Fixed. Sin embargo, estos datos pueden inducir a error ya que al añadir nuestros extractos al radical DPPH este reacciona rápidamente reduciéndose. Esto implica que al medir la absorbancia en un punto puede llevarnos a obtener datos poco fiables. Por tanto, el modo que mide la absorbancia durante un intervalo de tiempo determinado resulta ser el modo más fiable para medir la capacidad antioxidante de nuestras muestras de *Moringa oleifera*.

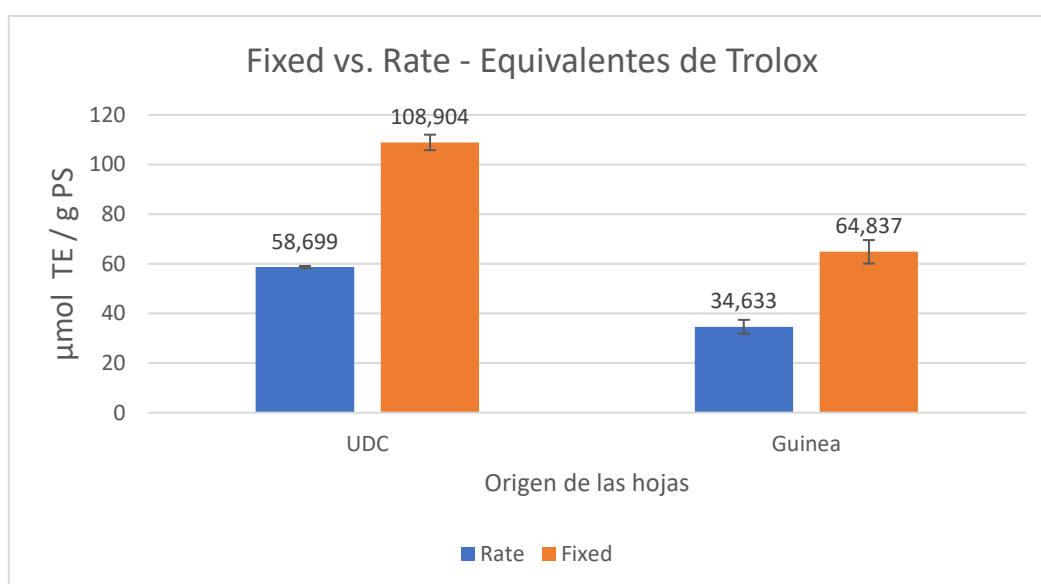


Figura 15: Gráfica comparativa de los distintos modos de medir la absorbancia, en equivalentes de Trolox.

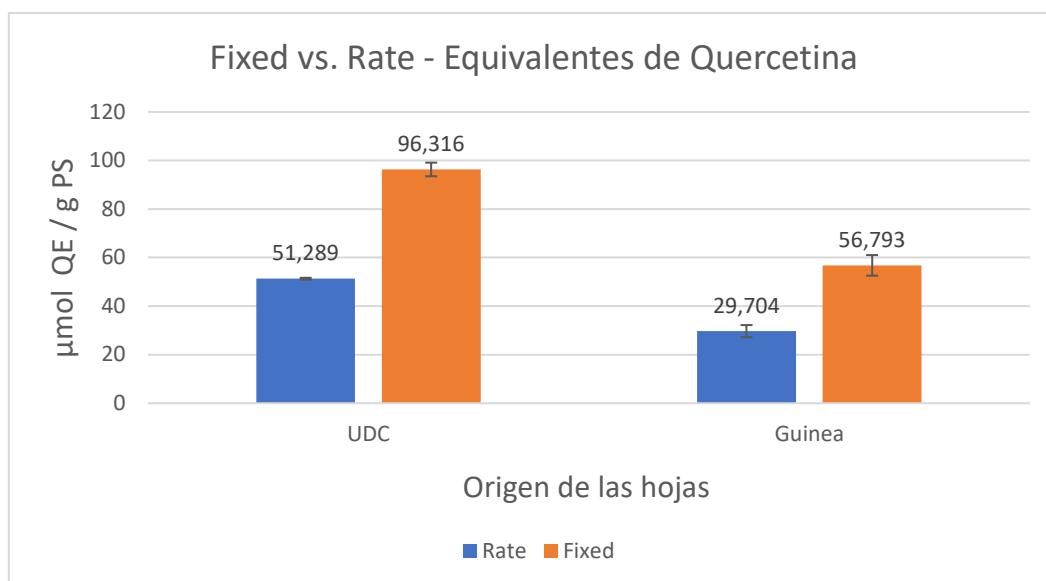


Figura 16: Gráfica comparativa de los distintos modos de medir la absorbancia, en equivalentes de quercetina.

4.3.1. Ensayo con DPPH

Los resultados obtenidos mediante el ensayo con DPPH muestran una mayor capacidad antioxidante en el polvo de hojas de *Moringa* de la UDC que en el de Guinea (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados del ensayo de DPPH.

Muestra	Metanol 80%		Acetonitrilo		Agua Destilada	
	µmol TE / g PS	µmol QE / g PS	µmol TE / g PS	µmol QE / g PS	µmol TE / g PS	µmol QE / g PS
UDC	31,778 ± 1,032	27,882 ± 0,926	39,960 ± 0,807	34,481 ± 0,723	58,699 ± 0,423	51,289 ± 0,379
Guinea	21,299 ± 1,974	18,424 ± 1,770	33,367 ± 0,496	28,568 ± 0,445	34,633 ± 2,785	29,704 ± 2,498

Tanto en la Tabla 5 como en los Figuras 17 y 18 podemos observar como las muestras que fueron extraídas con agua destilada poseen una mayor capacidad antioxidante que las extraídas con acetonitrilo y metanol, siendo este último el que menos capacidad antioxidante demostró en este ensayo. Estos resultados se contraponen con los obtenidos por Siddhuraju & Becker (2003) que observaron que tanto el metanol 80% como el etanol 70% son los mejores solventes para la extracción de compuestos antioxidantes en hojas de *Moringa*.

Los valores obtenidos en equivalentes de Trolox (TE) y Quercetina (QE) son similares, siendo algo menores en el caso de la Quercetina (Figuras 17 y 18). Esto abre la posibilidad de que nuestros extractos tengan un mayor contenido de fenoles simples que de fenoles complejos.

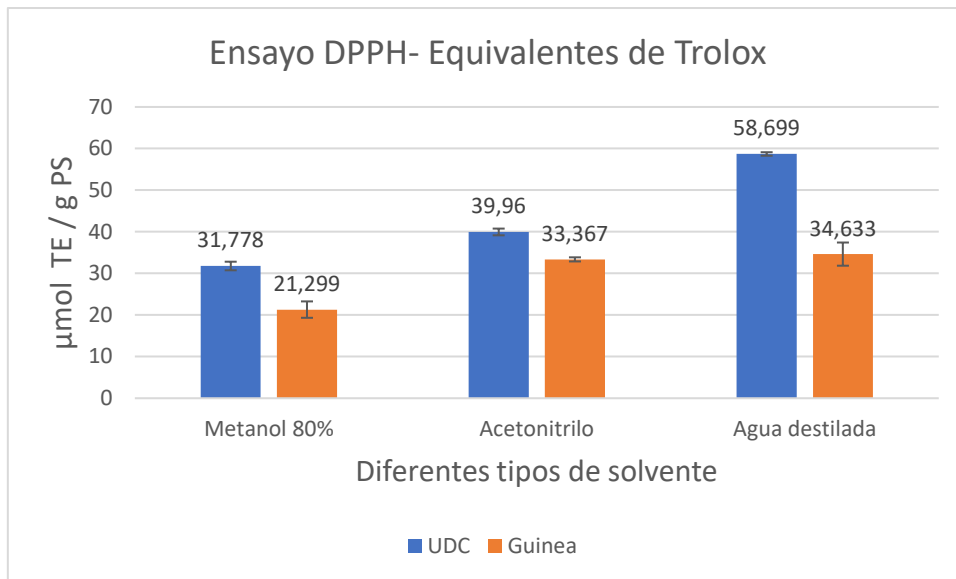


Figura 17: Resultados del ensayo de DPPH en equivalentes de Trolox.

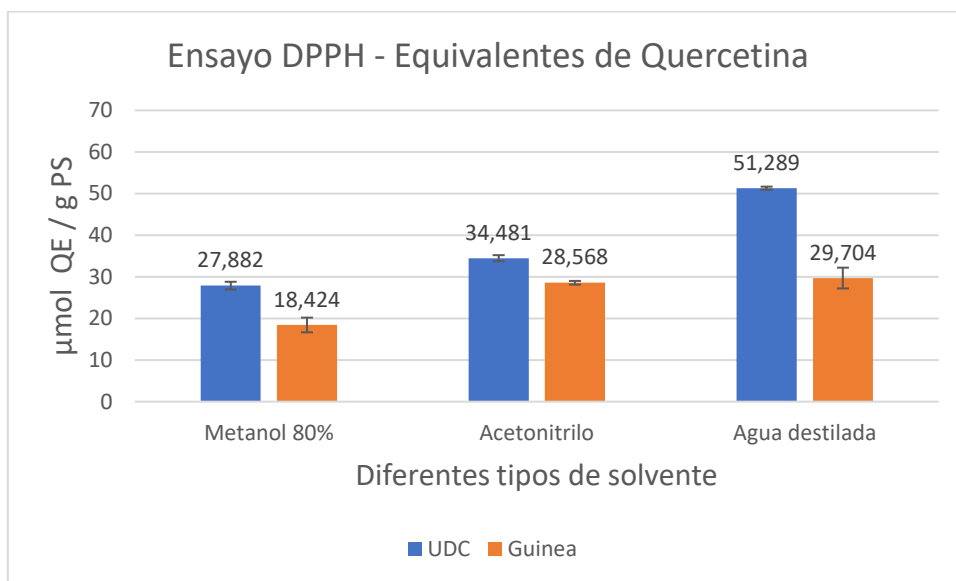


Figura 18: Resultados del ensayo de DPPH en equivalentes de quercetina.

4.3.2. Ensayo con ABTS

En el ensayo del ABTS confirmamos los resultados obtenidos con el DPPH ya que obtenemos una mayor capacidad antioxidante en el polvo de *Moringa* de la UDC respecto al polvo de Guinea (Tabla 6).

En el ABTS encontramos unos valores diferentes de capacidad antioxidante con respecto al DPPH en función del solvente utilizado para la extracción. El agua destilada sigue siendo el solvente que más actividad antioxidante posee, sin embargo, el metanol posee unos niveles similares y supera al acetonitrilo.

Tabla 6: Resultados del ensayo de ABTS.

Muestra	Metanol 80%		Acetonitrilo		Agua Destilada	
	$\mu\text{mol TE} / \text{g PS}$	$\mu\text{mol QE} / \text{g PS}$	$\mu\text{mol TE} / \text{g PS}$	$\mu\text{mol QE} / \text{g PS}$	$\mu\text{mol TE} / \text{g PS}$	$\mu\text{mol QE} / \text{g PS}$
UDC	213,981 ± 9,960	151,823 ± 7,283	193,479 ± 1,784	136,831 ± 1,304	214,667 ± 6,824	151,743 ± 5,163
Guinea	122,086 ± 9,728	84,625 ± 7,114	112,426 ± 10,688	77,562 ± 7,816	138,809 ± 1,677	96,854 ± 6,133

Los valores obtenidos en equivalentes de Trolox (TE) y en equivalentes de Quercetina (QE) son similares, al igual que con el DPPH la quercetina nos da valores ligeramente menores que el Trolox (Figuras 19 y 20) con lo que asentamos nuestra suposición de que nuestra muestra tiene más compuestos fenólicos simples que polifenoles.

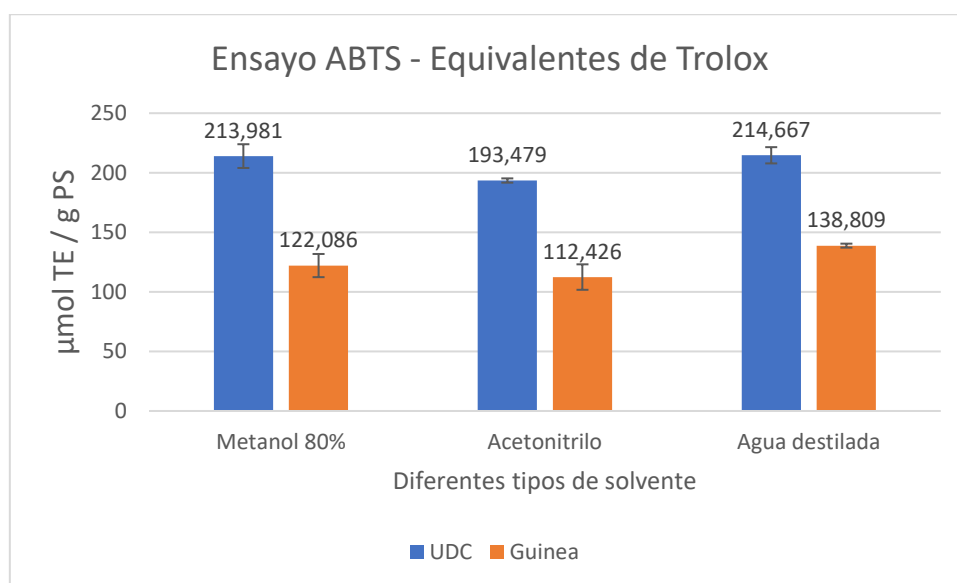


Figura 19: Resultados del ensayo de ABTS en equivalentes de Trolox.

Con el ABTS obtenemos unos valores más altos de capacidad antioxidante que con el DPPH. Esto nos confirma que el ABTS es un compuesto mucho más sensible y que se reduce más rápido en presencia de antioxidantes. Esto último coincide con los resultados que se obtuvieron en otras investigaciones (Thaipong et al., 2006; Fitriana et al., 2016). En el ensayo del DPPH, la acción de eliminar de radicales libres puede ser debida a la capacidad de donar hidrógenos, mientras que la reducción del radical de ABTS es debida a la eliminación de radicales protónicos inducida a través de la donación de electrones (Fitriana et al., 2016).

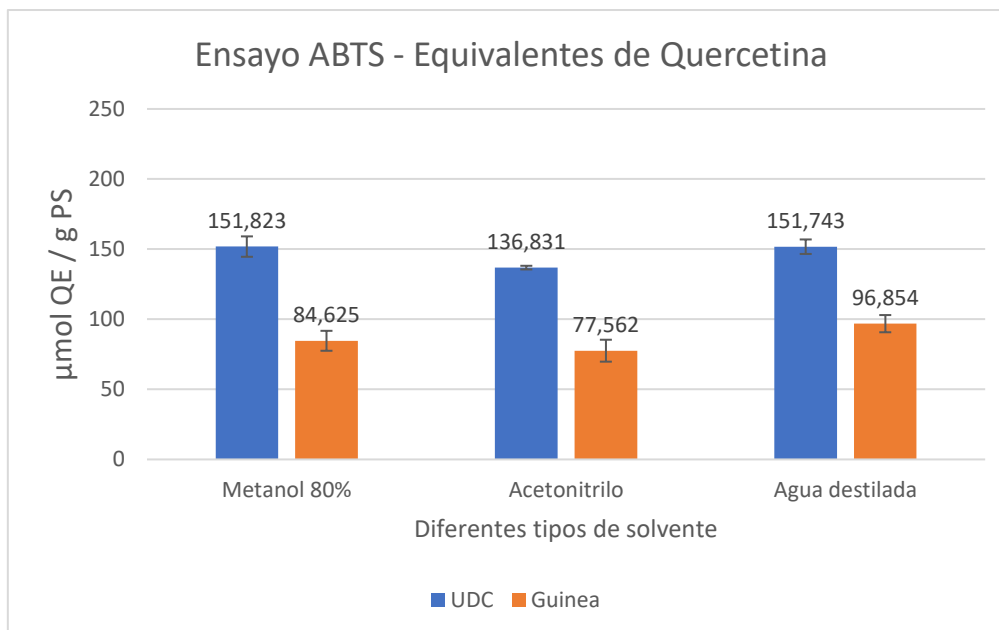


Figura 20: Resultados del ensayo de ABTS en equivalentes de quercetina.

De cualquier forma, el DPPH sigue siendo un compuesto excelente para realizar este tipo de medidas ya que es más estable que el ABTS, más sencillo de preparar (no es necesario incubarlo 16h) y posee un alto nivel de reproducibilidad en las muestras (Thaipong et al., 2006).

Por otra parte, tanto con el DPPH como con el ABTS las hojas procedentes de la UDC siempre tienen más capacidad antioxidante que las hojas provenientes de Guinea, independientemente del método y del solvente utilizado.

4.3.3. Relación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante

Si analizamos nuestros resultados y comparamos las gráficas podemos comprobar como hay una relación directa entre la cantidad de fenoles y la capacidad antioxidante de nuestras muestras. Esto coincide con los estudios de otros investigadores como Fitriana et al. (2016) y Siddhuraju & Becker (2003).

Por tanto, los fenoles presentes en los extractos de *Moringa* son buenos donadores de electrones y pueden terminar la reacción en cadena de los radicales convirtiendo radicales libres en productos más estables (Siddhuraju & Becker, 2003).

5. Conclusiones

- a) El análisis elemental muestra un contenido similar en C e H de ambas muestras y resultados diferentes en N y S.
- b) Se ha puesto a punto el método de extracción de fenoles utilizando 3 solventes diferentes. Las muestras extraídas con agua destilada presentan un mayor contenido en compuestos fenólicos seguido del acetonitrilo y del metanol.
- c) En nuestro experimento, demostramos que las hojas de las plantas cultivadas en nuestro invernadero poseen una mayor cantidad de fenoles y que las de las cultivadas en Guinea.
- d) Los resultados obtenidos muestran que el polvo de hoja de *Moringa* de la UDC presenta una mayor capacidad antioxidante que el polvo de las hojas de Guinea, con independencia del método, el solvente y del patrón utilizado
- e) Con nuestros datos, podemos establecer una relación directa entre la cantidad de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

5. Conclusions

- a) The elemental analysis shows a similar content in C and H of both samples and different results in N and S.
- b) The method of extracting phenols has been developed using 3 different solvents. Samples extracted with distilled water have a higher content of phenolic compounds followed by acetonitrile and methanol.
- c) In our experiment, we showed that the leaves of the plants grown in our greenhouse have a greater amount of phenols than those grown in Guinea.
- d) The results obtained show that the *Moringa* leaf powder of the UDC has a higher antioxidant capacity than the Guinea leaf powder, regardless of the method, solvent and the pattern used.
- e) With our data, we can establish a direct relationship between the amount of total phenols and the antioxidant capacity.

6. Bibliografía

Agudo Medina, L. (2012) Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. Autodidacta Revista-Online. [Acceso 3 de Julio de 2017]. Disponible en:

http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R. (2015) Biochemistry and molecular biology of plants. Chichester, UK: Wiley, Chapter 24, pp. 1178-1185.

Díaz, J., Bernal, Á., Pomar, F. & Merino, F. (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant science, pp. 179-188.

Doberski J. (1986) Simple phenolic compounds and the growth of plants: a short review. Journal of Biological Education, 20:2, pp. 96-98.

Ferreira P., Farias D., Oliveira J., Carvalho A. (2008) *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. Revista de Nutrição, Campinas, 12(4), pp. 431-437.

Castro, A. (2016) Mejora de la propagación in vitro de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales [Proyecto de Fin de Máster]. A Coruña: Universidade da Coruña.

Fitriana W., Ersam T., Shimizu K., Fatmawati, S. (2016) Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. Indones. J. Chem., 16 (3), pp. 297-301.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999) Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, pp. 1035-1040.

Förster N., Ulrichs C. Schreiner M., Arndt N., Reinhard S. (2015) Ecotype variability in growth and secondary metabolite profile in *Moringa oleifera*: Impact of sulfur and water availability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, pp. 2852-2861.

Kraujalyte, V., Venskutonis, P., Pukalskas, A., Cesoniene, L. & Daubaras, L. (2015) Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. Food Chemistry, pp. 583-590.

Martins, N., Barros, L., Ferreira, I. (2015) In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. Trends in Food Science & Technology 48, pp. 1-12.

Navarro Garrido, P. (2015) *Moringa oleifera*: un aliado en la lucha contra la desnutrición. [Acceso 14 de Junio de 2017] Disponible en:

<https://www.accioncontraelhambre.org/sites/default/files/documents/moringa-final-pag-simples.pdf>

Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., García, L., Delporte, C. (2017) Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae Turcz.* Leaves of different genotypes. *Food Chemistry*, 215, pp. 219-227.

Pérez, A., Sánchez, T. and Armengol, N. (2010) Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark: una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*, Vol. 33, No. 4.

Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O' Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. and Mainland, C. (1998) Antioxidant Capacity as Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (7), pp. 2686-2693.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice- Evans C. (1998) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 26, Nos. 9/10 pp. 1231-1237.

Siddhuraju P., and Becker K. (2003) Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 2144-2155.

Slinkard, K. & Singleton, V. L., (1977) Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, pp. 49-55.

Taiz & Zieger, E. (2006) *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Chapter 13.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido E., Garrido J., Borges, F. (2013) Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Research International*.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Ceballos, L., Hawkins, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 669-675.

Van den Berg R., Haenen G., Van den Berg H., Van der Vijgh W., Bast A. (2000) The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70, pp. 391-395.

Velázquez-Zavala, M., Peón-Escalante, I. E., Zepeda-Bautista, R., & Jiménez-Arellanes, M. A. (2016) *Moringa (Moringa oleifera Lam.): Potential uses in agriculture, industry and medicine. Revista Chapingo Serie Horticultura*, 22(2), pp. 95-116.

Wang, Y., Gao, Y., Ding, H., Liu, S., Han, X., Gui, J., Liu, D. (2016) Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry* 218, pp. 152-158.