

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA TIERRA DE BARROS

IV Congreso Agroalimentario de Extremadura

CENTRO UNIVERSITARIO SANTA ANA ALMENDRALEJO



Del 3 al 6 de Mayo 2022

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS
IV CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

© ALBERTO CATILLO

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: Virginia Pedrero

ISBN: 978-84-7930-112-0

D.L.:

Imprime: Impresal

Extracción asistida por microondas para la obtención de flavonoides presentes en las hojas de *Moringa oleifera*

YERENA-PRIETO, B.J.^{1,2}

GARCÍA-ALVARADO, M.A.²

RODRÍGUEZ-JIMENES, G.C.²

PALMA, M.¹

FERNÁNDEZ BARBERO, G.¹

¹Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), IVAGRO, 11510, Puerto Real, Cádiz, España.

²Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Tecnológico Nacional de México (TecNM), Miguel Angel de Quevedo 2779, Colonia Formando Hogar, Veracruz 91860, Mexico.

RESUMEN

Las hojas de *Moringa oleifera* (moringa) tienen un alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, lo que las presenta como una fuente importante para la obtención de estos compuestos. Los flavonoides presentan un especial interés debido a su capacidad de prevenir ciertos procesos degenerativos asociados al estrés oxidativo. En el presente estudio se propone el desarrollo de un método de extracción asistida por microon-

das (MAE) para la extracción de los flavonoides mayoritarios en las hojas de moringa. Diferentes variables de extracción, incluida la composición del disolvente, el pH, la temperatura y la relación muestra-disolvente se estudiaron aplicando la metodología de superficie de respuesta de Box-Behnken. La temperatura y ratio fueron las variables más influyentes en la extracción de flavonoides (51 °C y 19.8 mL/0.2 g) así como su iteración. El método desarrollado presentó alta repetibilidad y precisión intermedia (RSD < 5%) y un tiempo de extracción óptimo de 15 minutos.

Palabras claves: *Moringa oleifera*, Box-Behnken, flavonoides, extracción asistida por microondas, UHPLC.

ABSTRACT

The leaves of *Moringa oleifera* (moringa) have a high content of phenolic compounds, mainly flavonoids, which presents them as a promising source for the extraction of these compounds. Flavonoids are of special interest due to their ability to prevent certain degenerative processes associated with oxidative stress. The present study proposes the development of a microwave-assisted extraction method for the extraction of the majority flavonoids in moringa leaves. Different extraction variables, including solvent composition, pH, temperature and sample-solvent ratio were studied applying the Box-Behnken response surface methodology. The temperature and the ratio were the most influential variables in the extraction of flavonoids (51 °C and 19.8 mL/0.2 g). The developed method presented high repeatability and intermediate precision (RSD < 5%) and an optimal extraction time of 15 minutes.

Key words: *Moringa oleifera*, Box-Behnken, flavonoids, microwave-assisted extraction, UHPLC.

1. INTRODUCCIÓN

El árbol de *Moringa oleifera* pertenece a la familia *Moringaceae* del cual se desprenden trece variedades diferentes siendo la *Moringa oleifera* la más cultivada debido a su adaptación a cualquier tipo de suelo y rápido crecimiento. Es originario de la India y es una especie económicamente valiosa para el sur de Asia y actualmente lleva varios años como parte de la horticultura tradicional del trópico seco mexicano, donde es cultivado prin-

principalmente para fines ornamentales. Las hojas de moringa son una fuente importante de antioxidantes naturales, identificándose principalmente por su alto contenido de compuestos fenólicos (Manguro and Lemmen 2007; Olson and Fahey 2011), capaces de prevenir procesos degenerativos, los cuales están asociados a un exceso de radicales libres en el organismo. Actualmente existen numerosos estudios que han confirmado que el consumo de hojas de moringa ayuda a disminuir el riesgo de padecer diversas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, las cuales están relacionadas con el estrés oxidativo (Anwar et al., 2007; Bharali 2003; Mehta et al., 2003). Debido a lo antes mencionado, este trabajo se va a centrar en el estudio de dichos compuestos, especialmente en los derivados de quercetina y kaempferol, ya que se considera que la moringa es una fuente prometedora de estos fitoquímicos (Coppin et al., 2013; Karthivashan et al., 2013; Oldoni et al., 2019).

Con el objetivo de controlar la calidad de estos compuestos bioactivos, es de gran interés contar con técnicas de extracción rápidas y eficientes. La maceración o la agitación magnética, son algunas de las técnicas tradicionales más utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos de hojas de moringa y otras matrices vegetales. No obstante, estas técnicas presentan algunas desventajas como largos tiempos de extracción para producir rendimientos satisfactorios, lo que a su vez implica un alto consumo de disolventes y, por tanto, un incremento de costes. Este estudio propone como solución a dichos problemas evaluar la técnica de extracción asistida por microondas (MAE) para la extracción de flavonoides en hojas de moringa. MAE es un prometedor método de extracción verde que tiene la ventaja de reducir tanto el tiempo de extracción como el consumo de disolvente (Spigno and de Faveri 2009; Zhao et al., 2018). La extracción se acelera debido a los cambios en la anatomía celular causados por el impacto de la radiación de microondas (Bouras et al., 2015). Concretamente, se basa en la aplicación de radiación electromagnética con una frecuencia de 0,3 a 300 GHz. Esta radiación conduce a un rápido y localizado calentamiento del disolvente y la muestra, lo cual genera una acumulación de presión dentro de las células de la muestra. Dicha presión modifica las propiedades físicas de los tejidos biológicos, mejorando la porosidad de la matriz biológica y permitiendo una mejor penetración del disolvente de extracción a través de la matriz (Haddadi-Guemghar et al., 2014).

Además de seleccionar el método de extracción más adecuado, hay que tener en cuenta que la eficiencia de MAE puede verse afectada por diversas variables como el disolvente (volumen, composición, pH), la temperatura, el tiempo de extracción, etc. (Routray and Orsat 2012). Por esta razón, el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) es una de las estrategias más empleadas a la hora desarrollar métodos de extracción. RSM es un tipo de diseño de experimento que permite conocer los efectos de las diferentes variables y sus interacciones y determinar las condiciones más óptimas para cada una de ellas. En el presente estudio se empleó el diseño de Box-Behnken (BBD). Este tipo de diseños son de gran utilidad ya que el número de experimentos necesarios para obtener resultados estadísticamente aceptables es más bajo que en otros diseños estadísticos, y además asegura que cada experimento esté en la región de interés, evitando condiciones extremas de operación (Razali et al., 2012).

Por todo esto, el objetivo del presente estudio fue el desarrollo de un método de extracción asistida por microondas basado en el uso de mezclas de metanol/agua como disolvente para extraer los flavonoides mayoritarios en las hojas deshidratadas de moringa. Tener métodos de extracción eficientes es muy útil principalmente en laboratorios analíticos y empresas dedicadas a la fabricación de productos enriquecidos con flavonoides ya que permite evaluar la calidad de las diferentes muestras y cultivos y de esta manera seleccionar de forma analítica aquellas muestras que sean más ricas en estos compuestos y, por tanto, que presenten mejores características biofuncionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico y reactivos

El material biológico empleado en este estudio para la extracción de flavonoides fue las hojas de moringa. Las hojas fueron cultivadas en el Instituto Tecnológico Nacional de México campus Veracruz. Las hojas fueron lavadas con agua para eliminar el polvo, se pesaron pequeños lotes de 200 g para realizar el secado por lecho fluidizado, el cual se llevo a cabo en un secador por lecho fluidizado Apex Modelo SSE65 (Veracruz, México). Se colocarán 150 g de hoja fresca en el secador, controlando la temperatura a 55 °C y la velocidad del aire a 1,5 m/s, durante 90 minutos. Finalmente,

las hojas deshidratadas se almacenaron en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Con respecto a los reactivos, para MAE se emplearon como disolventes, mezclas de metanol (Fischer Chemical, Loughborough, Reino Unido) de pureza HPLC y agua Milli-Q, obtenida mediante un sistema de purificación Millipore (Bedford, MA, EEUU). Además, los disolventes presentaron distintos valores de pH por lo que fue necesario el empleo de una disolución de HCl (0,1 M) y una de NaOH (0,1 M), ambas obtenidos de Panreac (Barcelona, España), para su ajuste. Para el análisis de los compuestos mediante cromatografía líquida se empleó acetonitrilo de grado HPLC (Panreac, Barcelona, España), agua Milli-Q, obtenida mediante el sistema de purificación Millipore y ácido acético (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para la cuantificación de los compuestos extraídos se empleó queretina 3-O-glucósido (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU) como estándar comercial.

2.2. Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción de los flavonoides se llevó a cabo mediante extracción asistida por microondas. Los parámetros integrados en el diseño experimental fueron: composición del disolvente (50, 75, y 100% de metanol en agua), pH (2, 5 y 8), temperatura (50, 87,5 y 125 $^{\circ}\text{C}$) y relación masa/disolvente (0,2:10, 0,2:15 y 0,2/20 g:mL). Los extractos se obtuvieron utilizando un sistema de tecnología MARS One Touch™ (1800 W) (CEM Corporation, Matthews, NC, EEUU). Se pesaron 0,2 g de moringa triturada en un recipiente MARSXpress (CEM Corporation) y se aplicó el volumen de disolvente y las condiciones de extracción según el diseño de experimentos. El tiempo de extracción inicial fue de 5 min, seguido por un tiempo de 20 minutos de enfriamiento de la muestra. Finalmente, los extractos se centrifugaron (7500 rpm, 5 min) y se añadió el sobrenadante a un matraz aforado de 25 mL. A los precipitados se les agregó 5 mL del mismo disolvente y se centrifugaron nuevamente. Finalmente, todos los sobrenadantes se traspasaron al mismo matraz aforado y este se aforó con el mismo disolvente. Los extractos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis por cromatografía líquida de ultra-alta eficacia.

2.3. Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia

Para llevar a cabo la cuantificación y análisis de los flavonoides presentes en las hojas de moringa se empleó la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC) acoplada a una matriz de fotodiodos (PDA). Concretamente, se empleó un equipo ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU). Con respecto al método de análisis se empleó un método desarrollado previamente por el grupo de investigación el cual permite analizar y cuantificar los 6 flavonoides mayoritarios en menos de 5 min. El método de análisis emplea una columna de fase reversa Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Waters, Milford, MA, EEUU), la temperatura de la columna fue de 47 °C, el caudal fue de 0,6 mL min^{-1} y el volumen de inyección de 3,0 μL . La fase móvil consistió en un gradiente con dos disolventes: la fase A estuvo formada por ácido acético al 2% en agua Milli Q y la fase B estuvo formada por ácido acético al 2% en acetonitrilo. El gradiente de separación utilizado fue el siguiente: 0,0 min, 0% B; 1 min, 5% B; 2 minutos, 10% B; 3 minutos, 15% B; 4 minutos, 20% B; 5 minutos, 30% B; 7 minutos, 35% B; 8 minutos, 40% B; 10 minutos, 75% B; y 12 min, 0% B. En la Figura 1 se muestra el cromatograma obtenido con los 6 compuestos previamente identificados por el grupo de investigación: Q3GLU: quercetina 3-glucosido; QMGLU: quercetina malonil glucosido; QHMGGLU: quercetina 3 hidroxil metilglutaril galactosido; QA-GLU: quercetina acetyl glucosido; K3GLU: kaempferol 3-glucosido; I3GLU: isorhamnetina 3-glucosido (Yerena-Prieto et al., 2022). El sistema UHPLC fue controlado mediante el Software Empower™ 3 (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU). La cuantificación de dichos compuestos se llevó a cabo empleando quercetina 3-O-glucósido como patrón de referencia. Concretamente, a partir de la recta de calibrado de dicho compuesto ($0,5\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$, $y = 10065,86x + 1930,29$ $R^2 0,9998$) se obtuvo una recta de calibrado para cada uno de los flavonoides identificados en las hojas de moringa, suponiendo una absorbancia similar entre ellos y teniendo en cuenta el peso molecular de cada compuesto: quercetina 3-glucósido, 464; quercetina malonil glucósido, 550; quercetina hidroxil metil glutaroil glucósido, 608; quercetina acetyl glucósido, 506 kaempferol 3-glucósido, 448 e isorhamnetina 3-glucósido, 478.

2.4. Diseño de Box-Behnken

Para la optimización del método de extracción se empleó el diseño de superficie de respuesta de Box-Behnken con cuatro factores y tres niveles para cada factor (nivel bajo (-1), nivel medio (0) y nivel alto (1)). Los cuatro factores (variables independientes) estudiados en este trabajo fueron la composición del disolvente (porcentaje de metanol en agua) (X_1), pH del disolvente (X_2), temperatura de extracción (X_3) y relación muestra-disolvente (X_4). La variable respuesta (variable dependiente) optimizada fue la cantidad total de flavonoides expresado en mg g^{-1} , la cual se calculó mediante la suma de los flavonoides individuales establecidos como referencia. El diseño experimental consistió en 27 ensayos realizados por duplicado, con tres repeticiones en el punto central para calcular el error. Toda la matriz experimental realizada, así como los resultados experimentales y predichos se muestran en la Tabla 1. El tratamiento de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), donde se puede conocer la significancia estadística, el ajuste y los términos de regresión. Para llevar a cabo todo el diseño experimental se empleó el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EEUU).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Desarrollo del método de MAE

Para el desarrollo y optimización del método de MAE para la obtención de flavonoides en hojas de moringa deshidratadas se llevó a cabo un diseño de Box-Behnken (BBD). Todos los rangos de estudio se seleccionaron de acuerdo con la experiencia previa del grupo. La temperatura fue el único factor que se estudió de manera independiente, para determinar el rango de estudio, ya que es un factor que afecta en gran medida al rendimiento de la extracción. De hecho, temperaturas excesivamente altas pueden provocar degradación de los compuestos fenólicos, mientras que temperaturas demasiado bajas pueden llevar a un bajo rendimiento de extracción (Pereira et al., 2019). Por esta razón, se estudió como afectaba al rendimiento de extracción en función de la temperatura manteniendo el resto de las condiciones de extracción constantes (50:50 MeOH:H₂O como disolvente de extracción, 15 mL de disolvente y 20 min de tiempo de extracción). Aplicando el mismo protocolo explicado en la sección 2.2, se evaluaron los siguientes

niveles de temperatura: 50, 75, 100, 125, 150 y 175 °C y cada experimento se realizó por triplicado. Para obtener un extracto de control, se realizó una extracción en las mismas condiciones intermedias, pero sin aplicar una temperatura externa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2 donde se puede observar cómo el contenido total de flavonoides varía en función de la temperatura de extracción. Concretamente a partir de los 100 °C se puede observar una disminución significativa de la concentración de flavonoides. Como resultado de este estudio, se decidió trabajar en un rango de temperaturas de 50 a 125 °C.

Una vez seleccionados los rangos de estudio y realizado el diseño de experimentos (Tabla 1), se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) con el fin de evaluar el efecto de los factores de interés, así como las interacciones sobre la variable respuesta. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla 2. Se ha trabajado a un nivel de confianza del 95% con respecto a la respuesta, por lo que aquellos factores y/o interacciones con p -valores inferiores a 0,05 tenían una influencia relevante sobre la misma. Esta información se complementó con un diagrama de Pareto (Figura 3), donde se representan los efectos relevantes de todas las variables, tanto lineales como cuadráticas, así como sus interacciones. Los efectos se muestran en orden decreciente de importancia. La longitud de cada barra es proporcional a la magnitud absoluta de los coeficientes de los efectos estimados, mientras que la línea vertical representa la magnitud mínima de los efectos estadísticamente significativos (nivel de confianza del 95%) con respecto a la respuesta. En esta gráfica se puede observar que el factor más influyente fue el ratio (X_4) seguido de la temperatura (X_3), así como la interacción de ambos factores (X_4X_3). En este diagrama se puede observar el efecto positivo o negativo del factor sobre la variable de respuesta. En este sentido, la temperatura mostró un efecto negativo en la respuesta (1.0727), lo que indica que la temperatura en los niveles bajos estudiados en este trabajo favorece la extracción de flavonoides. Con respecto al ratio, este mostró un efecto inverso (2.2055), es decir, al aumentar el ratio se mejoró el rendimiento de la extracción de los compuestos estudiados; este efecto se puede atribuir a la saturación del disolvente de extracción a volúmenes más pequeños. Este resultado es esperado ya que relaciones muestra vegetal/ volumen de disolvente empleado en el proceso de extracción, son más eficientes cuando la cantidad de disolvente es elevada. Generalmente, grandes cantidades de disolvente pueden disolver constituyentes más eficientemente, conduciendo a un aumento del rendimiento de extracción (Li, Chen, and Yao 2005). Por el contrario, pe-

queñas relaciones de disolvente-material vegetal, pueden propiciar bajos rendimientos de extracción debido a que se alcanza el equilibrio (Valachovic, Pechova, and Mason, 2001) y al no existir una diferencia de concentración del metabolito en la fase líquida y dentro de la matriz vegetal, finaliza el proceso de transferencia de masa. Por consiguiente, la elección de volúmenes apropiados de disolventes es un factor muy importante a tener en cuenta en un proceso de extracción. El ANOVA del modelo de regresión se presenta en la siguiente ecuación, donde se muestra que los valores del coeficiente de determinación (R^2) y del coeficiente de determinación ajustado por g.l. (R^2) fueron 87 y 72% respectivamente, lo que sugiere un alto grado de correlación entre los valores observados y predichos.

$$\text{mg CFT} = 7.48003 + 0.482421*X_1 + 0.00101434*X_2 - 1.07279*X_3 + 2.20555*X_4 - 0.78748*X_1^2 - 0.846983*X_1*X_2 - 0.169234*X_1*X_3 + 0.422024*X_1*X_4 + 0.183631*X_2^2 + 0.000863463*X_2*X_3 - 0.530464*X_2*X_4 - 0.495124*X_3^2 - 2.01232*X_3*X_4 - 0.431888*X_4^2.$$

3.2. Condiciones óptimas

El ANOVA proporcionó también información con respecto a los valores de cada factor para obtener una respuesta máxima, para este estudio la máxima concentración de flavonoides. Los valores que permiten obtener la mayor concentración de CFT (13,2726 mg CFT/ g de extracto) fueron: 83,75% de metanol en agua con un pH 2 como disolvente, temperatura de extracción de 50,5 °C y 0,2:19,8 g:mL de relación muestra-disolvente. Se puede observar, tal y como se ha comentado anteriormente, que la mayor concentración de flavonoides se consigue al emplear un nivel bajo de la temperatura en el rango estudiado, así como un volumen mayor de disolvente (ratio); el estudio de este último factor es de gran importancia, ya que un ratio no adecuado puede llevar a la subestimación de la variable de respuesta debido a la saturación de los sólidos extraíbles en el disolvente y con ello un bajo rendimiento de la extracción.

3.3. Estudio del tiempo óptimo de extracción y de la precisión del método

Una vez obtenidos los valores óptimos de los factores de extracción, se utilizaron para determinar el tiempo óptimo de extracción, con la finalidad de evitar la degradación de los compuestos de interés por largos tiempo de exposición y por ende un mayor gasto energético. Para este propósito, se

realizaron varias extracciones dejando constante los valores óptimos mencionados en la sección anterior y variando el tiempo de extracción en los siguientes valores: 2, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 min. Las muestras se filtraron y se analizaron mediante HPLC y se calcularon las eficiencias de extracción de los flavonoides. Al comparar estos resultados, se evaluó la estabilidad durante el tiempo de extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, donde se puede observar cómo la cantidad de flavonoides extraídos va aumentando a medida que aumenta el tiempo de extracción hasta los 15 minutos. A partir de este tiempo se aprecia una disminución en el contenido de flavonoides, probablemente debida a una degradación de dichos compuestos al verse sometidos durante tanto tiempo a las condiciones de MAE. Con base a estos resultados se decidió seleccionar 15 min como el tiempo óptimo dado que la difusión del soluto en el disolvente tiene lugar en los primeros minutos de la extracción (Zhao et al., 2018). Finalmente, se estudió la precisión del método desarrollado en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para ello, se realizaron 10 experimentos por día durante un total de 3 días consecutivos para hacer un total de 30 experimentos. La precisión se evaluó analizando el coeficiente de variación (CV) de los 30 experimentos, mientras que la repetibilidad se determinó calculando los CV de cada uno de los 10 experimentos realizados en un solo día. El porcentaje de repetibilidad obtenido fue de 3,15%, mientras que la precisión intermedia fue de 4,01%. Dado que los valores de ambos CV son menores del 5%, límite que se suele establecer para este tipo de procesos, se puede considerar que el método tiene una buena repetibilidad y precisión intermedia (Association of Official Analytical Chemists. 1998).

4. CONCLUSIONES

En este estudio, se utilizó un diseño de Box-Behnken para investigar el efecto que ejercen los factores evaluados sobre la MAE de flavonoides en las hojas de moringa. La MAE se ha confirmado como una técnica eficiente para la extracción de flavonoides, así, los resultados experimentales revelaron que las variables de extracción más influyentes fueron: ratio (19,8 mL/0,2 g) y la temperatura 50,5 °C. Además, el tiempo que se necesitó para obtener la máxima concentración de CFT fue de 15 minutos. El método desarrollado presentó también una buena repetibilidad y precisión intermedia (RSD < 5%). Finalmente se ha demostrado que MAE es un método rápido para la obtención de compuestos fenólicos y el método desarrollado puede usarse con fines analíticos para la determinación de la calidad de hojas de moringa en función de su contenido en flavonoides.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al proyecto "EQC2018-005135-P" (Equipo para cromatografía líquida mediante espectrometría de masas y cromatografía iónica) así como al Tecnológico Nacional de México (Proyecto TNM 10088.21-P) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a Beatriz Juliana Yerena Prieto (Nº CVU: 766097).

BIBLIOGRAFÍA

ANWAR, F., LATIF, S., ASHRAF, M., & GILANI, A. H. (2007). “*Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses”. *Phytotherapy Research*, 21, 17–25.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (1998). *AOAC® “peer-verified methods program: manual on policies and procedures”*. AOAC International.

BHARALI, R., J. T. Y M. R. H. AZAD. (2003). “Chemomodulatory Effect of *Moringa Oleifera*, Lam, on Hepatic Carcinogen Metabolising Enzymes, Antioxidant Parameters and Skin Papillomagenesis in Mice”. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 4, 131–139.

BOURAS, M., CHADNI, M., BARBA, F. J., GRIMI, N., BALS, O., & VOROBIEV, E. (2015). “Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark”. *Industrial Crops and Products*, 77, 590–601.

COPPIN, J. P., XU, Y., CHEN, H., PAN, M. H., HO, C. T., JULIANI, R., SIMON, J. E., & WU, Q. (2013). “Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*”. *Journal of Functional Foods*, 5, 1892–1899.

HADDADI-GUEMGHAR, H., JANEL, N., DAIROU, J., REMINI, H., & MADANI, K. (2014). “Optimization of microwave-assisted extraction of prune (*Prunus domestica*) antioxidants by response surface methodology”. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2158–2166.

KARTHIVASHAN, G., TANGESTANI FARD, M., ARULSELVAN, P., ABAS, F., & FAKURAZI, S. (2013). “Identification of bioactive candidate compounds responsible for oxidative challenge from hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves”. *Journal of Food Science*, 78, 1368–1365.

LI, H., CHEN, B., & YAO, S. (2005). “Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*)”. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 295–300.

MANGURO, L. O. A., & LEMMEN, P. (2007). “Phenolics of *Moringa oleifera* leaves”. *Natural Product Research*, 21, 56–68.

MEHTA, K., BALARAMAN, R., AMIN, A. H., BAFNA, P. A., & GULATI, O. D. (2003). “Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits”. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 2–3.

OLDONI, T. L. C., MERLIN, N., KARLING, M., CARPES, S. T., ALENCAR, S. M. DE, MORALES, R. G. F., SILVA, E. A. DA, & PILAU, E. J. (2019). "Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil". *Food Research International*, 125, 108647.

OLSON, M. E., & FAHEY, J. W. (2011). "*Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas *Moringa oleifera*: a multipurpose tree for the dry tropics". *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1071-1082.

PEREIRA, D. T. V., TARONE, A. G., CAZARIN, C. B. B., BARBERO, G. F., & MARTÍNEZ, J. (2019). "Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc". *Journal of Food Engineering*, 240, 105-113.

RAZALI, M. A. A., SANUSI, N., ISMAIL, H., OTHMAN, N., & ARIFFIN, A. (2012). "Application of response surface methodology (RSM) for optimization of cassava starch grafted polyDADMAC synthesis for cationic properties". *Starch-Stärke*, 64, 935-943.

ROUTRAY, W., & ORSAT, V. (2012). "Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review". In *Food and Bioprocess Technology*, 5, 409-424.

SPIGNO, G., & DE FAVERI, D. M. (2009). "Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study". *Journal of Food Engineering*, 93, 210-217.

VALACHOVIC, P., PECHOVA, A., & MASON, T. J. (N.D.) (2001). "Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction". *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 111-117.

YERENA-PRIETO, B. J., GONZALEZ-GONZALEZ, M., VÁZQUEZ-ESPINOSA, M., GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A. V., GARCÍA-ALVARADO, M. Á., PALMA, M., RODRÍGUEZ-JIMENES, G. DEL C., & BARBERO, G. F. (2022). "Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Method Applied to the Extraction of Flavonoids from *Moringa* Leaves (*Moringa oleifera* Lam.)". *Agronomy*, 12, 261.

ZHAO, C. N., ZHANG, J. J., LI, Y., MENG, X., & LI, H. BIN. (2018). "Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Melastoma sanguineum* fruit: Optimization and identification". *Molecules*, 23, 2498.

FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Matriz de experimento para el desarrollo del método de MAE para flavonoides en hojas de moringa.

Experimento	Respuestas					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	CFT (mg g ⁻¹)	
					Experimental	Estimado
1	-1	-1	0	0	4.46012	5.54576
2	1	-1	0	0	8.58158	8.20457
3	-1	1	0	0	7.06592	7.24176
4	1	1	0	0	7.79945	6.51263
5	0	0	-1	-1	4.25255	3.40795
6	0	0	1	-1	4.95219	5.287
7	0	0	-1	1	12.3797	11.8437
8	0	0	1	1	5.03002	5.67345
9	0	0	0	0	7.33064	7.48003
10	-1	0	0	-1	3.73699	3.99472
11	1	0	0	-1	4.41726	4.11551
12	-1	0	0	1	7.14728	7.56177
13	1	0	0	1	9.51564	9.37066
14	0	-1	-1	0	7.61435	8.24118
15	0	1	-1	0	6.73896	8.24149
16	0	-1	1	0	7.48365	6.09387
17	0	1	1	0	6.61171	6.09762
18	0	0	0	0	7.54904	7.48003
19	0	-1	0	-1	4.2349	4.49475
20	0	1	0	-1	5.26374	5.55771
21	0	-1	0	1	10.1723	9.96677
22	0	1	0	1	9.0793	8.90787
23	-1	0	-1	0	8.00402	6.61857
24	1	0	-1	0	7.28521	7.92188
25	-1	0	1	0	5.35969	4.81145
26	1	0	1	0	3.96394	5.43782
27	0	0	0	0	7.56041	7.48003

Tabla 2. Resultados del análisis de ANOVA para el desarrollo del método MAE para flavonoides en hojas de moringa.

Términos	Coefficientes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-valor	p-valor
X_1 -Metanol	0.964842	0.0000123465	1	2.79276	2.27	0.1581
X_2 -pH	0.00202867	13.8107	1	0.0000123465	0.00	0.9975
X_3 -Temperatura	-2.14559	58.3733	1	13.8107	11.21	0.0058
X_4 -Ratio	4.4111	3.30733	1	58.3733	47.37	0.0000
$X_1 X_1$	-1.57496	2.86952	1	3.30733	2.68	0.1273
$X_1 X_2$	-1.69397	0.11456	1	2.86952	2.33	0.1529
$X_1 X_3$	-0.338468	0.712416	1	0.11456	0.09	0.7657
$X_1 X_4$	0.844047	0.179841	1	0.712416	0.58	0.4617
$X_2 X_2$	0.367261	0.00000298228	1	0.179841	0.15	0.7091
$X_2 X_3$	0.00172693	1.12557	1	0.00000298228	0.00	0.9988
$X_3 X_4$	-1.06093	1.30745	1	1.12557	0.91	0.3581
$X_3 X_3$	-0.990247	16.1977	1	1.30745	1.06	0.3233
$X_3 X_4$	-4.02464	0.994811	1	16.1977	13.14	0.0035
$X_4 X_4$	-0.863775	14.7877	1	0.994811	0.81	0.3866
Error total		116.344	12	1.23231		
Total (corr.)		2.79276	26			

Figura 1. Cromatograma de los flavonoides en el extracto de moringa obtenido por UHPLC-DAD ($\lambda = 260 \text{ nm}$). Q3GLU (1): quercetina 3-glucósido; QMGLU (2): quercetina malonil glucósido; QHMGLU (3): quercetina hidroximetil glutaroil glucósido; QAGLU (4): quercetina acetil glucósido; K3GLU (5): kaempferol 3-glucósido; I3GLU (6): isorhamnetina 3-glucósido.

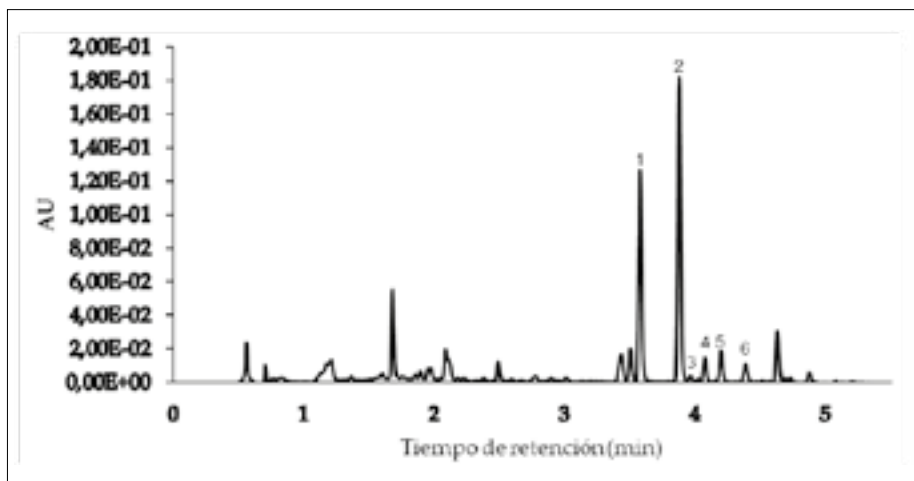


Figura 2. Estudio de la estabilidad de extracción de flavonoides en hojas de moringa.

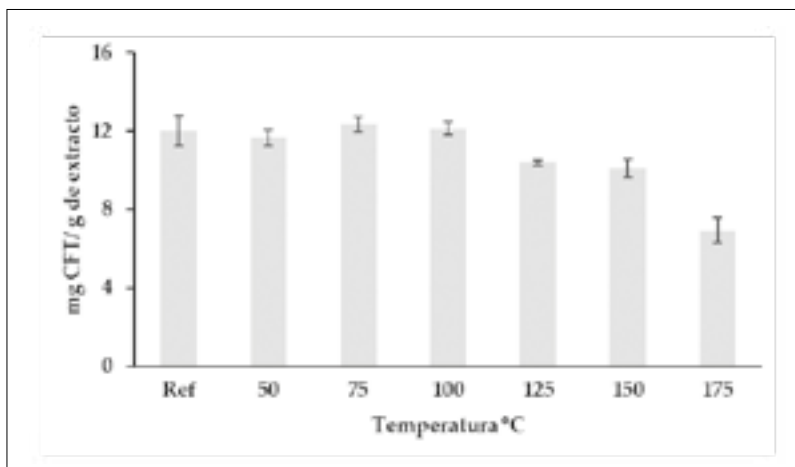


Figura 3. Diagrama de Pareto de la extracción por MAE de flavonoides en hojas de moringa.

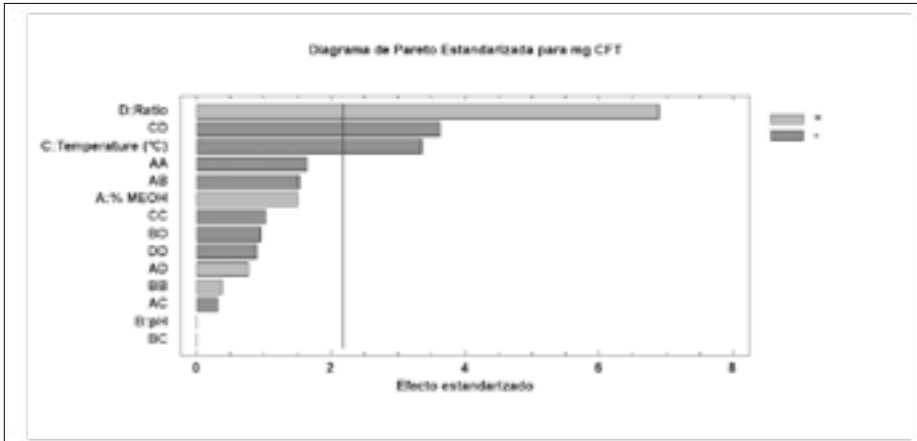


Figura 4. Optimización del tiempo para la extracción de flavonoides por MAE.

