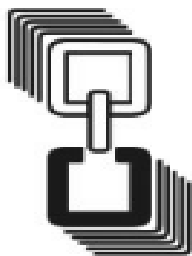


UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL FRANCISCO DE MIRANDA



PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA

PASANTÍAS INDUSTRIALES II

ÁREA DE TECNOLOGÍA

NÚCLEO EL SABINO



**DETERMINACION DE FLAVONOIDES EN LAS SEMILLAS DE ACACIAS
(*Mimosaceae leguminosae*) Y DE MORINGA (*Moringa oleífera*), PROVENIENTE DEL
ESTADO FALCON.**

Br. Viloría Custodio

Autor

C.I. 19.131.493

chichirivicheviloría@gmail.com

Ing. Luris Loaiza

Tutor Industrial

C.I. 13.444.398

Luris1979@hotmail.com

Ing. Bernarda Rivas

Tutor Académico

C.I. 14.562.720

Bnrl@hotmail.com

SANTA ANA DE CORO, ESTADO FALCON

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice general.....	ii
Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Introducción.....	
Planteamiento del Problema.....	
Objetivo General.....	
Objetivos Específicos.....	
Justificación del Problema.....	
Fases de la investigación.....	
Resultados y Análisis de resultados	
Conclusiones.....	
Recomendaciones.....	
Referencias Bibliográficas.....	
Apéndice.....	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1-. Variación en la absorción UV de los Flavonoides (mg de catequina /g extracto semillas de acacias).....	
2-. Variación en la absorción UV de los Flavonoides (mg de catequina /g extracto semillas de moringa)	
3-. Preparación de la curva de calibrado.....	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág
1-. Semillas de acacias (<i>Mimosaceae leguminosae</i>) y de moringa (<i>Moringa oleífera</i>), proveniente del estado Falcón.	
2-. Envases de vidrio envuelto con papel aluminio, utilizado para conservar las muestras molida.....	
3-. Proceso de pesado de la muestras en la balanza.....	
4-. Agitacion de la muetras utilizando las planchas magneticas a temperatura ambiente.....	
5-. Proceso de filtacion de la muestra.....	
6-. Soluciones preparadas (NaNO_2 al 5%, de AlCl_3 al 10% y NaOH 1M).....	
7-. Muestras previamente preparadas para medir.....	
8-. Estructura básica del esqueleto flavonólico.....	
9-. Equipo implementado para la identificación de flavonoides (espectrofotómetro.....	
10-. Curva de calibración de catequina para determinación de flavonoides.....	

INTRODUCCION

Las planta y semillas producen diversos tipos de compuestos que se han clasificado en dos grandes grupos: Metabolitos primarios, encargado de los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, asimilación de nutrientes y diferenciación. A este grupo pertenecen la clorofila, los amino ácidos, nucleótidos, carbohidratos simples y lípidos de membranas. Metabolitos secundarios, los cuales no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta y presenta una distribución restringida en el reino vegetal, terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados pertenecen a este grupo (Bruneton, 1991; Taiz, 2002), a esta clasificación pertenecen los flavonoides.

Los flavonoides son de bajo peso molecular que parten un esqueleto básico de 15 carbono ($C_6-C_3-C_6$) compuesto por dos anillos fenilos (A y B) ligado a través de un anillo (C) de pirano y constituyen la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Inicialmente, los flavonoides se consideraron sustancias sin valor para la salud humana pero, desde los años treinta, poco a poco, fueron poniendo de manifiesto múltiples efectos beneficiosos, algunos de ellos, gracias a su acción antioxidante y de eliminación de radicales libres. Las cantidades de flavonoides que contienen los extractos de semillas pueden variar ampliamente en función de las distintas características de las plantas (clima, grado de maduración, etc.). Existe en el mercado un creciente interés en poder conocer mejor, tanto la composición de estos complementos alimenticios, como el proceso de liberación de los diferentes componentes en general y de los flavonoides en particular. Recientemente, han aparecido los primeros productos comercializados conteniendo flavonoides con características de liberación sostenida.

Otros dos grupos de flavonoides encontrado en flores, semillas y todas las plantas verde son las flavonas y flavonoles. Estos flavonoides UV-B dependiente, generalmente absorben una longitud de ondas corta de luz solar las que no son visibles por el ojo humano (Taiz, 2002). La función de esta dos clases flavonoides es proteger las células de la excesiva radiación UV-B (280 a 320 nm) ya que se acumulan en el estrato epidérmico de la hoja, semillas y tallos verdes absorbiendo fuertemente la luz en la región UV-B y permitiendo el paso de la luz visible o de mayores longitudes de ondas a las células fotosintetizadoras.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los flavonoides se encuentran en frutas, semillas, verduras, cerveza, vinos, té verde, te negro y soja los cuales son consumido de manera habitual. También pueden incorporarse de forma de complementos, junto con ciertas vitaminas y minerales (Cadena, 1999; Martínez, et al. 2002). Los flavonoides se encuentran en la plantas tanto en estado libre como formando glucósidos; estos últimos son los que constituyen a darle color a las flores, fruto, semillas y hojas.

La presencia de flavonoides en la naturaleza y sus potenciales beneficios en la salud humana ha concitado un creciente interés en su estudio, otras de sus funciones no menos importante son sus efectos antifungicos, bactericidas en el organismo y participan en el metabolismos celular, también actúan como inhibidores enzimáticos y en proceso de transferencia de energía, se suma beneficio por tener actividad farmacológica, como antialérgicos, antiinflamatorios, antivirales y antidepresivos, además poseen efecto citoprotectores bien patente en fibroblasto en la piel humana.

En medicinas populares se utilizado en enfermedades hepáticas, dolor de cabeza, indigestiones, meteorismo y reumatismo entre otros. En general las propiedades de la semilla de moringa y de acacia pueden resumirse en las siguientes: es un estimulante de la digestión y también tiene propiedades de sedante en el sistema nervioso, contienen flavonoides, minerales, ácidos orgánicos, lípidos y alrededor de 20 alcaloides.

Cada día es más frecuente encontrar en el mercado de los complementos alimenticios productos a base de extractos de plantas y semillas que reivindican determinadas actividades beneficiosas. Muchos de los complementos alimenticios utilizan en su composición extractos secos de vegetales conteniendo flavonoides.

En estas investigación, se pretende determinar flavonoides en las semillas de acacias (*Mimosaceae leguminosae*) y de moringa (*Moringa oleífera*), proveniente del estado Falcón para obtener los diferentes extractos de las semillas, se utilizara el método de maceración pasiva de tal manera que el métodos que se utilizara para identificar flavonoides es por medio del análisis óptico (espectrofotometría).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Objetivo General

Determinar flavonoides en las semillas de acacias (*Mimosaceae leguminosae*) y de moringa (*Moringa oleífera*), proveniente del estado Falcón.

Objetivos Específicos

- 1-.Obtener el rendimiento de los diferentes extractos de cada semilla usando la técnica de maceración pasiva a temperatura ambiente.
- 2-.Identificar los flavonoides presente en cada extracto a través del método de análisis óptico (espectrofotometría).
- 3-.Determinar las mejores condiciones de operación de los extractos, aplicando paquete estadístico infostat.

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la naturaleza existe prácticamente un medio millar de especie de planta y semillas superiores. Sin embargo solo el 5-10% ha sido investigado respecto a su composición química, relación estructura- función o actividad biológica. Debido a esto es necesario investigar rigurosamente los compuestos químico especialmente presente en plantas, semillas y flores que puedan tener un potencial de metabolitos secundario, basados en el grupo de oxidación del puente de tres carbonos los flavonoides son esqueleto de carbono básico y puede tener numerosos sustituyente.

Independientemente de su origen, los radicales libre afecta a compuesto celulares como proteína, lípidos y ácidos nucleicos produciendo un gran daño e incluso muerte celular. Frente a los daños que produce la oxidación el organismo despliega sistema antioxidante que operan a través de moléculas que protegen la estructura biológica impidiendo que sean oxidadas cuando el equilibrio que existe entre antioxidante y oxidante se pierde a favor de los radicales libres, recae en un estrés oxidativo y se produce una enfermedad, los flavonoides son moléculas que entregan sus electrones a los radicales libre, poniendo fin a la cadena de oxidación.

Los sistema antioxidante (flavonoide) pueden ser enzimático y no enzimáticos, la primera defensa es enzimática se origina en el interior del organismo y opera de dos forma, evita la formación de radicales libre a partir de otra molécula, o convierte a los radicales libre existente en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar. A esta primera barrera se le suma la de los antioxidantes no enzimáticos esta segunda defensa estas formada por distintos compuesto que atrapan o neutralizan los radicales libre interrumpiendo la reacción en cadena.

La utilización de complemento antioxidante brinda ventajas sobre otros tipos de suplemento: Es una técnica sencilla y eficiente para la conservación de recursos alimenticios de disponibilidad estacional (semilla de acacia y moringa etc.). Su extracción es muy flexible, lo cual permite utilizar los ingredientes de mayor disponibilidad del estado Falcón. Son fáciles de almacenar y de transportar, ya sea como suplemento alimenticio.

FASES DE LA INVESTIGACION

Fase I: Obtención del rendimiento de los diferentes extractos de cada semilla usando la técnica de maceración pasiva a temperatura ambiente

En esta fases se seleccionaron las semillas de acacias (*Mimosaceae leguminosae*) y de moringa (*Moringa oleífera*) fueron recolectadas en el complejo académico los Perozo de la universidad nacional experimental “Francisco de Miranda” ubicada en la variante sur “José Leonardo chirino” de la cuidad Santa Ana de Coro estado Falcón.



Figura N° 1. Semillas de acacias (*Mimosaceae leguminosae*) y de moringa (*Moringa oleífera*), proveniente del estado Falcón.

Las semillas previamente seleccionadas fueron colocadas en unas bandeja de aluminio separadas, tapadas e identificas, posteriormente se dejaron secar por 8 dias a temperatura ambiente. Despues de transcurir el tiempo de secado las semillas se pulverisaron utilizando un montero de porcelana, se utlizo este procedimiento para evitar hacer la molienda con objetos metalico (picadora), debido a la desventaja que exite al extraer principios volátiles o muy termosensibles de tal manera se debe tener encuesta que el friccion que producen los elementos metálicos durante el proceso puede disminuir el rendimiento del principio de interés por volatilización y descomposición.

Las semillas pulverizadas se colocaron en frascos de vidrio envueltos con papel de aluminio para que no le pegara los rayos UV-B y no se degraden Los principales activos de tal manera que son identificado por cada semilla.



Figura N° 2. Envases de vidrio envuelto con papel aluminio, utilizado para conservar las muestras molidas.

Para obtener los diferentes extractos se utilizó el método de maceración pasiva, la relación sólido- líquido fue de 1/10. La mezcla de solventes de extracción utilizados fueron metanol- agua 75-25% y etanol-agua 75-25%. La extracción se realizó a temperatura ambiente por 2 horas. Todos los extractos concentrados se obtuvieron por remoción al vacío del solvente en un rotoevaporador dependiendo de la naturaleza del solvente. Se almacenaron en envases ámbar bajo condiciones de refrigeración. Las mediciones se realizaron por triplicado.



Figura N° 3. Proceso de pesado de las muestras en la balanza



Figura N° 4. Agitacion de la muestras utilizando las planchas magneticas a temperatura ambiente.



Figura N° 5. Proceso de filtracion de la muestra.

Fase II: Identificar los flavonoides presente en cada extracto a través del método de análisis óptico (espectrofotometría).

Se utilizó una solución estándar de catequina 0,2 mg/mL de la cual se tomaron volúmenes de 0 μ L a 100 μ L en intervalos de 20 μ L. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 1250 μ L de agua destilada y después se le adiciono 75 μ L de NaNO₂ al 5%, se dejaron reposar 6min. Se adicionaron 150 μ L de AlCl₃ al 10% se dejó reposar 5min. Después de esto se adicionaron 500 μ L de NaOH 1M y finalmente se completó el volumen de cada referencia y muestra a 2,5mL con agua destilada. La absorbancia fue medida antes de 30min a 420nm después de haber realizado un barrido de 300-800 nm, se estableció el rango lineal del método de 3-15mg/L de catequina.



**Figura N° 6. Soluciones preparadas
(NaNO_2 al 5%, de AlCl_3 al 10% y NaOH 1M)**

Los extractos de las semillas se les determinaron el contenido de flavonoides mediante el método espectrofotometría (análisis óptico) el cual emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo especificado de longitudes de ondas. Una lámpara de tungsteno suministra la radiación visible y otra de arco deuterio, la ultravioleta. Estas mediciones se realizaron en una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico, para luego elegir la absorbancia máxima de flavonoides que presentaron valores. A las especie de estudio que presentaron altos valores de absorbancia fue necesario hacerles diluciones al 50% bcon 2940 μL de agua destilada y 60 μL de la muestra para evitar el desviaciones de la ley de Beer, todo los extracto fueron estudiado por triplicado.



Figura N° 7. Muestras previamente preparadas para medir.

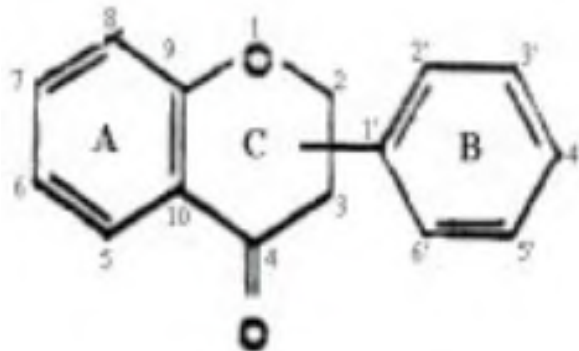


Figura N° 8 Estructura básica del esqueleto flavonólico.



**Figura N° 9. Equipo implementado para la identificación de flavonoides
(espectrofotómetro)**

Fase III: Determinar las mejores condiciones de operación de los extractos, aplicando paquete estadístico infostat.

Se realizó un estudio a través del paquete estadístico infostat que permitió determinar la influencia de cada uno de los procesos de extracción sobre sus propiedades fisicoquímicas y rendimientos. El paquete estadístico a través de la estadística básica facilitó procesar la cantidad de datos obtenidos aplicando Tukey.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Fase I. Obtencion de los extratos de cada planta usando los solvente metanol y etanol.

Se llevo acabo los extractos de las plantas empleando por el metodo de maceneracion pasiva , utilizando ambas semillas pulverisadas y los dos tipos de solventes metanol-agua (75-25%) y etanol – agua (75-25%) . las condiciones de las extracciones fueron uniforme, para lograr obtener resultados precisos los solventes que fueron elegidos se escogieron con el fin de probar el nivel optimo para la extraccion final y para ello se estudio sus respectivas polaridades.

Fase II: Identificar los flavonoides presente en cada extracto a través del método de análisis óptico (espectrofotometría).

Los extracciones obtenidas se midieron para identificar que cantidad de flavoniodes se encuentra en los extractos de las semillas. La longitud de onda utilizada fue 420 nm y el intervalo lineal encontrado utilizando catequina como patrón estuvo comprendido entre 100-50 mg/L, fuero del límite permitido que es de 10 mg/L.

En la Tabla 1 y 2 se tiene la concentración de flavonoides en cada extracto de las semillas estudiadas.

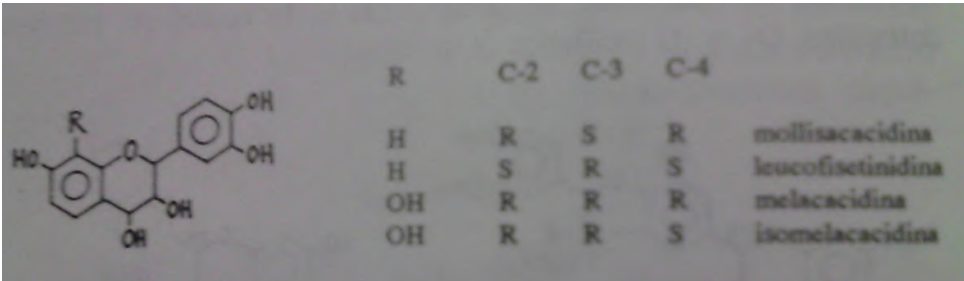
Tabla N° 1. Variación en la absorción UV de los Flavonoides (mg de catequina /g extracto semillas de acacias)

Muestras de semilla	Solvente	solvente
Acacias	Etanol-Agua	Metanol-Agua
Muestra N° 1	237	48
Muestra N° 2	224	70
Muestra N° 3	312	75

Fuente: Propia del Autor 2016.

Los flavan-3,4-dioles monomericos se localizan principalmente en las especie del genero de acacias; la estereoquímica de C-2, C-3, y C-4, pueden variar como se muestra en la figura a continuación.

Figura N° 10 Estructura del C-2



El corrimiento en onda alta, se observa que la estructura del C-2 en los flavan-3,4-dioles se apantalla en unos 18-19 ppm en etanol y 281-300 ppm en metanol esto provoca la deshidratación seguida de la oxidación, por el oxígeno del aire, originando la sal de flavilio, por esta razón se conocen estos flavonoides como leucoatocianidinas. Por su parte, la racemizacion de la catequina debe pasar por un doble enlace C-2, C-3 y rotura del enlace C-2-oxigeno, de tal manera que los flavan-3,4-dioles son resistente a la racemizacion.

Tabla N° 2. Variación en la absorción UV de los Flavonoides (mg de catequina /g extracto semillas de moringa)

Muestras de semilla	Solvente	solvente
Moringa	Etanol-Agua	Metanol-Agua
Muestra N° 1	45	48
Muestra N° 2	50	56
Muestra N° 3	48	37

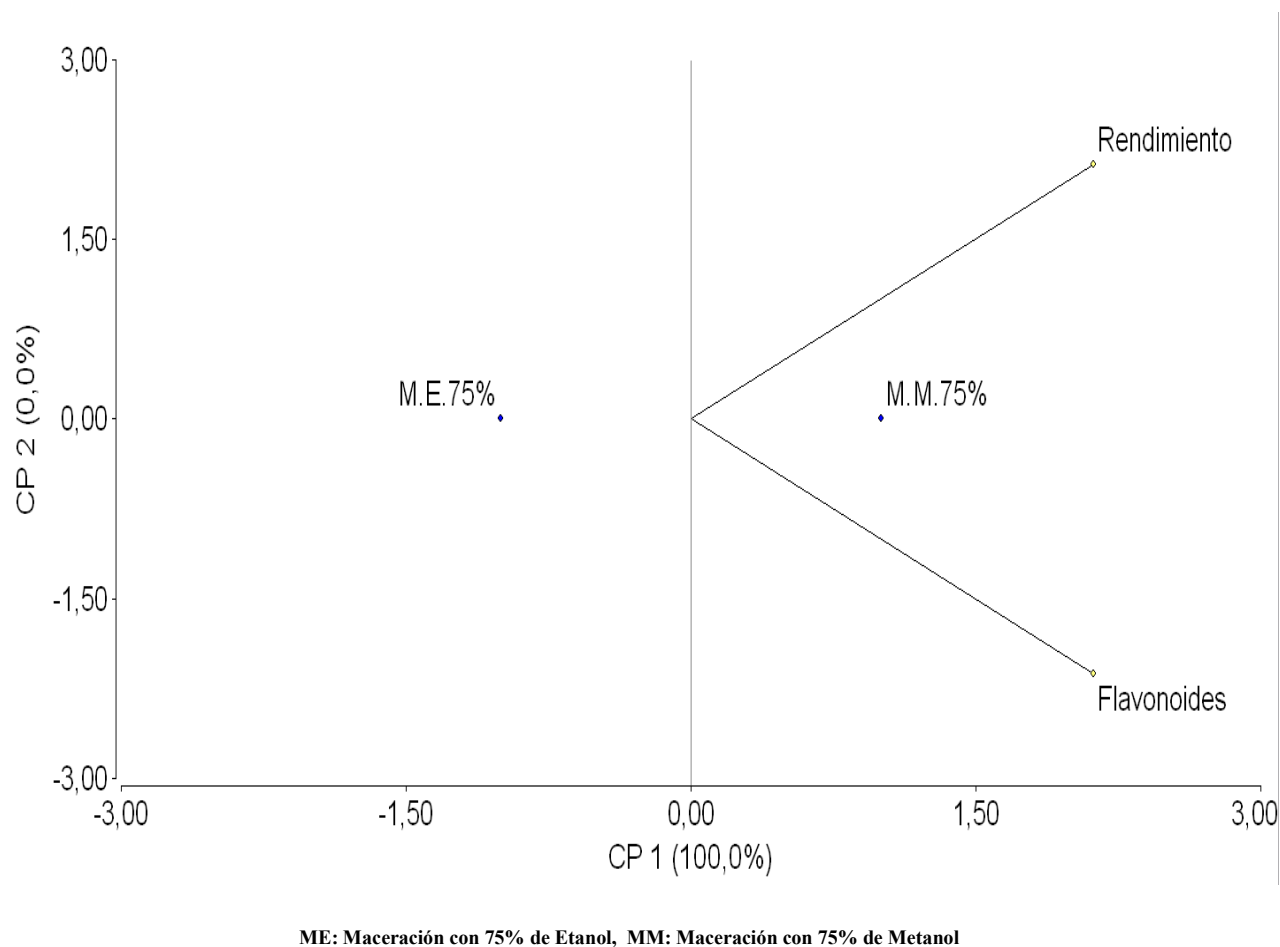
Fuente: Propia del Autor 2016.

Como se puede observar en los extractos que presentaron mayor concentración en la tabla N° 2, es la semilla de moringa tiene mayor concentración de flavonoides, con el solvente metanol-agua entre 196-226 ppm mientras que las otras muestras obtuvieron un intervalo

entre 192-200 ppm con etanol-agua. los flavonoides dependiendo de la estructura que presenta en cada extractos se obtiene una mayor extracción , ya que existe afinidad en cuanto a la polaridad entre los compuestos y el solvente de extracción utilizado.

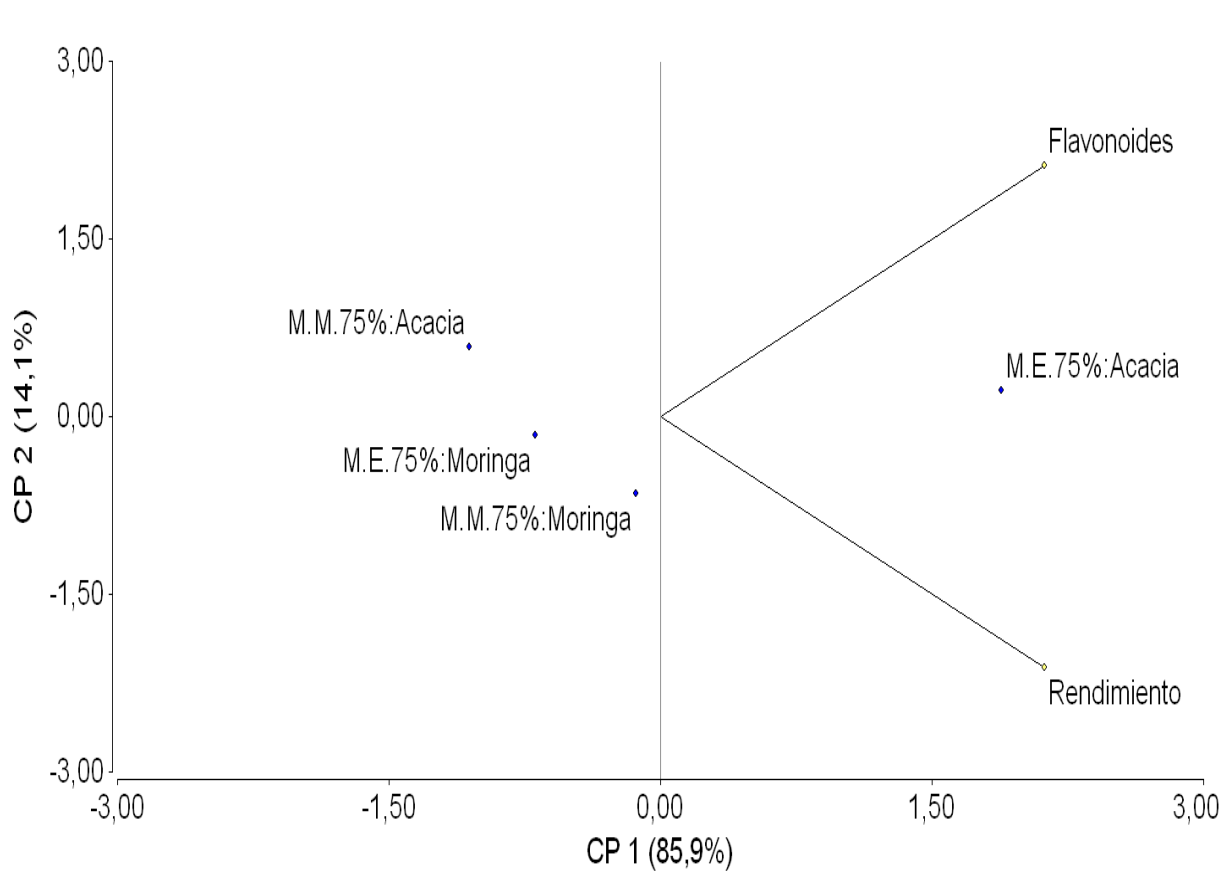
Fase III: Determinar las mejores condiciones de operación de los extractos, aplicando paquete estadístico infostat.

Figura N° 11 Análisis de componente principales en estudio del rendimiento de extracción con respecto a la concentración de flavonoides para la especie moringa utilizando el paquete estadístico infostat.



Como se observa en figura N° 11, la mejor condición de rendimiento y concentración de flavonoides es la M.M.M (Maceración Metanol-Moringa) utilizando 75% de metanol y 25 % de agua en la especie. Cabe señalar que la M.E.M (Maceración Etanol-Moringa) con 75% de etanol y 25% de agua tiene un impacto negativo sobre la maceración con metanol, esto se ve afectado desde el punto de vista estadístico (rendimiento-flavonoides).

Tabla N° 12 Análisis de componentes principales en estudio del rendimiento de extracción con respecto a la concentración de flavonoides para la especie moringa y acacia aplicando el paquete estadístico infostat.



M.E.Acacia: Maceración con 75% de Etanol; M.M.Acacia: Maceración con 75% de Metanol; M.E.Moringa: Maceración con 75% de Etanol; M.M.Moringa: Maceración con 75% de Metanol.

Para observar las mejores condiciones a lo que se refiere a factibilidad y calidad de los extractos obtenidos, se realizó un gráfico aplicando el paquete estadístico infostat haciendo un análisis de sus componentes principales que para este caso son rendimiento y flavonoides en la figura N° 12 muestra la influencia de cada extracción con respecto al rendimiento y flavonoides, pudiéndose observar que la maceración pasiva con 75% de etanol presenta mejores condiciones, cabe señalar que la maceración pasiva con 75% de metanol es la que reporte una segunda opción en cuanto a rendimiento obtenido, esto se debe a los componente químico de cada especie.

CONCLUSIONES

-Los extractos de las semilla de acacias (*Mimosaceae leguminosae*) y de moringa (*Moringa oleífera*), provenientes del estado falcón presentaron un alto contenido de flavonoides por lo cual se realizo una disolucion 50X a las especia que presetaron valores altos para identificar la cantidad de flavonoides obtenidas en dichos extractos.

-Dependiendo de la estructura del flavonoide presente en cada especie se obtiene una mayor extracción en función a la afinidad entre los compuestos y el solvente de extracción utilizado en cuanto a su polaridad.

-El método de espectrofotometría (análisis óptico) utilizado en este estudio hizo posible el logro del objetivo propuesto al inicio de este trabajo, logrando la identificación y concentración de flavonoides presente en las diferentes especias de semillas.

-Entre todas las propiedades biológicas, las de mayor interés han sido los antioxidantes, las cuales son blanco de un sin fin de estudio principalmente por corte clínica y nutricional, que por lo cual para lograr una mejor acción antioxidante se puede incluir en la dieta.

-Los flavan-3,4-diole monomérico se localizan principalmente en los géneros de acacia, el C-2 se apantalla en unos 18-19 ppm en etanol y 281-300 ppm en metanol esto provoca la deshidratación seguida de la oxidación, por el oxígeno del aire, originando la sal de flavilio, por esta razón se conocen estos flavonoides como leucoatocianidinas.

-la actividad de los flavonoides está asociada con el numero OH libre y la presencia de un patrón de hidroxilación orto, mientras que el nivel de oxidación del anillo central no parece jugar papel importante. Algunos regulan la germinación de semilla (alelopatía), imprimen resistencia a la infección de semillas y hojas actúan como fitoalexinas.

RECOMENDACIONES

- La muestra se tiene que tomar antes de que sean proyectado por los rayos UV-B, utilizando guantes para no, adherirle grasa a la muestras.
- Se debe remover todo el solvente para tener un extracto de calidad utilizando un rotoevaporador.
- Una vez selecciona la muestras se debe mantener en un lugar donde no sea afectada por la luz y se debe mantener tapado hasta que seque.
- No se debe utilizar objeto metálico (picadora), debido a la desventaja que existe al extraer principios volátiles o muy termosensibles de tal manera se debe tener en cuenta que la fricción que producen los elementos metálicos durante el proceso puede disminuir el rendimiento del principio de interés por volatilización y descomposición.
- Utilizar un mortero para realizar la respectiva pulverización de las semillas.
- Por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente un compuesto muy distinto.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

-Bornmam, J.F. 1999. *Localisation and functional significance of flavonoids and related compounds. Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems.* pp. 59-69.

-Cadena, E. 1999. *Sustancia Flavonoide en: Antioxidante y calidad de vida Online.* <http://www.antioxidante.com.ar/12/home2.htm>. (Julio 1999, consultado julio 2016).

-De Marcano, D et col.1991. *Fotoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas- Venezuela.*

-Pérez-Trueba, G. 2003. *Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes.* Rev. Cubana invest. Biomed., 22(1):48-57.

-Rivas Pérez, B.N (2015) *contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de orégano (oreganum vulgare l).(memoria de magister scientiarum en ciencia y tecnología de alimentos inédita) universidad del zulía, facultad de ingeniería. Maracaibo*

-Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant physiology, Sunderland: Sinaver Associates. 690 p. 3ª edición.*

-Velioglo, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D. 1998. *Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products.* J. Agric. Food Chem. 46, 4113-411.

APENDICE

APENDICE 1. Semillas de acacias (*Mimosaceae leguminosae*) y de moringa (*Moringa oleífera*), proveniente del estado Falcón

Apéndice 1.1. Peso de cada semilla en la balanza.

Tabla N° 3. Peso de inicio y peso final (después de 8 días de secado).

Especie	Peso inicial	Peso final
Semilla de Acacias	15,0395 gr	14,0354 gr
Semilla de Moringa	15,0227 gr	14,0035 gr

Nota: la variación de pesos que se expresa en el peso final, es una vez cumplido los 8 días de secado.

APENDICE 2. Proceso de agitacion en planchas magneticas.b

Apéndice 2.1 Agitación de la muestras con el solvente.

Tabla N° 4. Tiempo de agitación de los muestras en las planchas magnéticas.

ACACIAS	Tiempo		Solvente Metanol Agua	Hora 2 hora	Rpm 1150
Muestras / peso (gr)	t _o	t _f			
N°1 =10,0012	9:05 am	11:05 am			
N°2= 10,0021	9:05 am	11:05 am			
N°3= 10,0048	9:05 am	11:05 am			
MORINGA	t _o	t _f			
N°1 =10,0085	9:45 am	11:45 am			
N°2= 10,0015	9:45 am	11:45 am			
N°3= 10,0020	9:45 am	11:45 am			

Tabla N° 5. Tiempo de agitación de los muestras en las planchas magnéticas.

ACACIAS	Tiempo		Solvente Etanol Agua	Hora 2 hora	Rpm 1150
Muestras / peso (gr)	t _o	t _f			
N°1 =10,0020	7:45 am	9:45 am			
N°2= 10,0010	7:45 am	9:45 am			
N°3= 10,0042	7:45 am	9:45 am			
MORINGA	t _o	t _f			
N°1 =10,0010	8:45 am	10:45 am			
N°2= 10,0051	8:45 am	10:45 am			
N°3= 10,0025	8:45 am	1:45 am			

APENDICE 3. Cálculos para la determinación de los flavonoides en los extractos

Apéndice 3.1 Determinación de flavonoides

3.1.1. Preparación de la curva de calibrado de catequina

Tabla N° 6. Preparación de la curva de calibrado

Reactivo	Blanco	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3
Agua	1250µL	1250µL	1250µL	1250µL
Catequina 200mg/L	0 µL	20µL	40µL	80µL
NaNO ₂ 5%	75µL	75µL	75µL	75µL
AlCl ₃ 10%	150µL	150µL	150µL	150µL
NaOH 1 M	500µL	500µL	500µL	500µL
Concentración de los patrones(mg/L)		3	6	12
Absorbancia obtenida		0,040	0,070	0,136

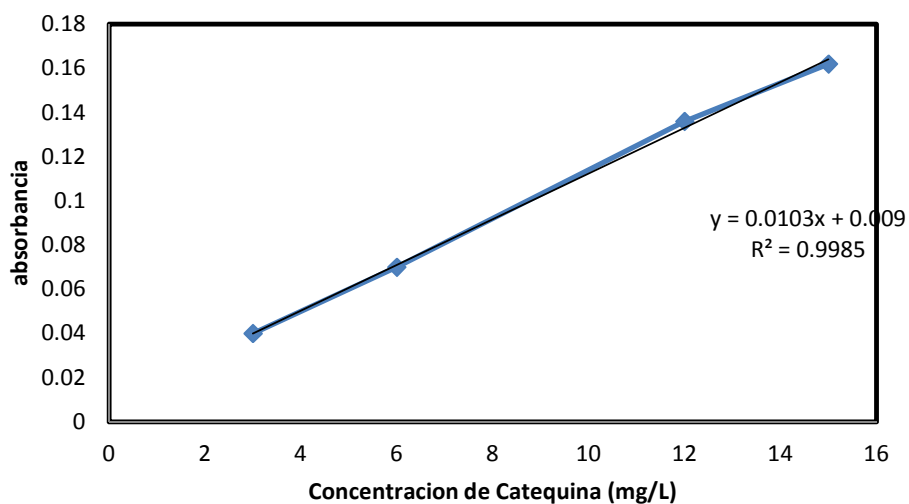


Figura 10. Curva de calibración de catequina para determinación de flavonoides

Con la curva de calibrado utilizando la ecuación arrojado se calcula la cantidad, obteniendo la relación en concentración en la cual se multiplica por 100 y por su factor de dilución en este caso 50. Si quiere expresar en mg/kg se divide entre el peso de la muestra.

APENDICE 4. Cálculos para la determinar mg/Kg

Apéndice 4.1 Utilizando la siguiente formulas:

$$mg/Kg = \frac{\frac{mg}{L} * VA(ml) * Fd}{peso muestra}$$

Dónde:

$$\frac{mg}{L} = \text{ppm}$$

$VA(ml)$ = volumen

Fd = Factor de dilución

$peso muestra$ = gr

Tabla N°7. Moringa (Moringa oleífera) Metanol-Agua

mg/L	Va	Fd	PM	mg/Kg
196	2,5	0	10,0012	48,9941
226	2,5	0	10,0025	56,4858
151	2,5	0	10,0042	37,7341

Tabla N° 8. Moringa (Moringa oleífera) Etanol-Agua

mg/L	Va	Fd	PM	mg/Kg
181	2,5	0	10,0010	45,2454
200	2,5	0	10,0051	49,9875
192	2,5	0	10,0076	47,9798

Tabla N° 9. Acacias (Mimosaceae leguminosae) Etanol-Agua

mg/L	Va	Fd	PM	mg/Kg
19	2,5	50	10,0020	237,4525

18	2,5	50	10,0010	224,9775
25	2,5	50	10,0045	312,3688

Tabla N° 10. b Acacias (Mimosaceae leguminosae) Metanol-Agua

mg/L	Va	Fd	PM	mg/Kg
191	2,5	0	10,0012	47,74427
281	2,5	0	10,0025	70,23244
300	2,5	0	10,0042	74,96851

