

## DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE TINTURAS ANTIOXIDANTES DE HOJAS DE *Morus alba* LINN (MORERA)

## DESIGN AND CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT TINCTURES FROM *Morus alba* LINN (MULBERRY) LEAVES

Quirino Arias-Cedeño<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6024-9877>  
Lázaro E. Valdés-Izaguirre<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5285-0264>  
Doralis Romero-Guerrero<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2992-1132>  
Beltis Villalona-Pons<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2145-2145>  
Yans Guardia-Puebla<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1347-0963>

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Química Aplicada, Universidad de Granma. Bayamo, Cuba

<sup>2</sup>Empresa Laboratorio Farmacéutico de Líquidos Orales, MEDILIP. Bayamo, Cuba

\*Autor para la correspondencia: [quirinoarias65@gmail.com](mailto:quirinoarias65@gmail.com)

Recibido: 24 de junio de 2024

Aprobado: 20 de julio de 2024

### RESUMEN

Con la finalidad de establecer los parámetros más favorables para la elaboración de las tinturas al 20 % de hojas de *Morus alba* L. con actividad antioxidante, se utilizó un diseño experimental de Taguchi con arreglo ortogonal L16, y se examinaron los resultados mediante un análisis de varianza. Las condiciones ensayadas seleccionadas fueron: droga seca de las variedades Doña Betty o Acorazonada, indistintamente; etanol al 70 % como mensturo, y el método de maceración. La calidad de las tinturas fue evaluada a través de parámetros organolépticos, químico-físicos y químicos. Se detectó abundancia de compuestos terpénicos, fenólicos y alcaloides en la composición fitoquímica, mostrando el mayor valor de contenido de fenoles totales en la tintura de la variedad Acorazonada. Todas las tinturas mostraron actividad reductora y antirradicalaria, lo que, unido al contenido de fenoles totales encontrado, fundamentan la actividad antioxidante y su potencial nutracéutico.

**Palabras clave:** *Morus alba*; tinturas; diseño experimental; fenoles totales; actividad antioxidante.

### ABSTRACT

In order to establish the most favorable parameters for the preparation of 20 % *Morus alba* L. leaf tinctures with antioxidant activity, a Taguchi experimental design with L16 orthogonal arrangement was used and the results were examined using an analysis of variance. The selected tested conditions were: dry drug of the Doña Betty or Acorazonada varieties, either, 70 % ethanol as mensturo and the maceration method. The quality of the tinctures was evaluated through organoleptic, chemical-physical and chemical parameters. An abundance of terpenic, phenolic and alkaloid compounds was detected in the phytochemical composition, with the tincture of the Acorazonada variety showing the highest value of total phenol content. All tinctures showed reducing and antiradical activity, which, together with the content of total phenols found, underlies the antioxidant activity and its nutraceutical potential.

**Keywords:** *Morus alba*; tinctures; experimental design; total phenols; antioxidant activity.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la medicina tradicional constituye el 40 % de la atención médica a nivel mundial, la cual depende, en gran medida, de remedios a base de plantas medicinales, las cuales desempeñan un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades humanas, y se consideran una fuente potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos. Se estima, que el valor anual de sus exportaciones mundiales supera los 60 000 millones de dólares estadounidenses, y crece a un ritmo del 6 %.<sup>(1)</sup>

Entre las enfermedades tratadas con plantas medicinales, se encuentra un amplio grupo de patologías asociadas al estrés oxidativo, tales como trastornos cardiovasculares, procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, y la diabetes mellitus, entre otras.<sup>(2)</sup> Tradicionalmente, las especies del género *Morus*, pertenecientes a la familia *Moraceae*, se han utilizado para la prevención de enfermedades hepáticas y renales, daño articular y antienvejecimiento, debido a sus propiedades antioxidantes.<sup>(3)</sup>

La especie *Morus alba* Linn, conocida popularmente como Morera, se ha asociado en la medicina tradicional oriental con un aumento en la calidad de vida y la longevidad; considerando que reduce la ansiedad y el estrés, controla el nivel de colesterol sanguíneo, la presión arterial, y combate el cáncer; además, sus hojas poseen efecto antidiabético. Su actividad biológica ha sido atribuida a la abundancia en su composición fitoquímica de metabolitos secundarios, descritos como agentes antioxidantes, tales como, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, ácido ascórbico y alcaloides.<sup>(4,5,6)</sup>

Las drogas de origen vegetal poseen variaciones en la composición fitoquímica, producidas por factores bióticos y abióticos, que muchas veces condicionan la eficacia en el tratamiento de las patologías para las que estén indicadas. Debido a ello, y a la inexistencia de un patrón de máxima producción, se hace necesario monitorear los valores para obtener fitofármacos seguros y eficaces.<sup>(7)</sup> Para su elaboración, una de las formas farmacéuticas líquidas más utilizadas son las tinturas, por sus ventajas en comparación con otras formas de uso, ya que ocupan un menor volumen, se almacenan mucho más tiempo, y su efecto es más rápido en el organismo, pero sus propiedades medicinales dependen de la droga vegetal.<sup>(8)</sup>

La elaboración de tinturas requiere del control de un conjunto de factores que pueden influir en la calidad de la formulación, implicando desarrollar un alto número de experimentos, por lo cual, el uso de herramientas del diseño experimental (DE) resulta de gran importancia, debido a la inexistencia de modelos teóricos que describan los procesos de formulación. El DE es una estrategia efectiva para procesos, cuyo rendimiento, es influenciado por varios factores; se puede conseguir no sólo su mejora, sino también reducir la variabilidad y los costos de producción, ahorrar tiempo y optimizar los recursos.<sup>(9)</sup> Las herramientas estadísticas permiten confirmar o validar el procedimiento empleado, manipulando, deliberadamente, una o más variables independientes para analizar las consecuencias que tiene sobre una o más variables dependientes.<sup>(10)</sup>

En la última década se ha incrementado la utilización del DE en estudios de procesos relacionados con el rendimiento y la actividad biológica de los productos naturales.<sup>(11,12)</sup> Entre estos diseños, el método o enfoque de Taguchi basado en arreglos ortogonales, resulta de gran utilidad, ya que se especializa en estimar efectos principales, y trabaja con una porción pequeña de las posibles combinaciones de factores de entrada, pero de manera que permite calcular los efectos de todos los factores de entrada en el resultado de interés.<sup>(13)</sup> Ha sido usado también, para optimización de procesos, utilizando el método para predecir y seleccionar el ajuste óptimo de los parámetros, y combinando la técnica con otros métodos estadísticos como el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los parámetros del proceso en las respuestas.<sup>(14)</sup>

Considerando la utilidad de las tinturas como forma farmacéutica líquida y, por otro lado, las propiedades biológicas de *M. alba*, fue interés de la empresa laboratorio Medilip elaborar una tintura madre a partir de las hojas de esta especie, por lo cual, el objetivo de este estudio consistió en diseñar las condiciones para el proceso de elaboración de tinturas al 20 % de hojas de *M. alba* con actividad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Productos Naturales del Centro de Estudios de Química Aplicada (CEQA) de la Universidad de Granma, y la Empresa Laboratorio Farmacéutico de Líquidos Orales (Medilip) del grupo BioCubaFarma.

### Material vegetal

El material vegetal (MV) seleccionado para el estudio fueron las hojas de cuatro variedades de la especie *M. alba* (Acorazonada, Doña Betty, Criolla y Yu-62). La recolección se realizó en la parcela experimental del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBV) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma, en el mes de noviembre, entre las ocho y nueve horas de la mañana. La temperatura ambiental durante la recolección fue de 27,5 °C, y la humedad relativa de 83 %.

La certificación de la identificación taxonómica de *M. alba* cultivada en la parcela se realizó en el Jardín Botánico Cupaynicu, perteneciente a la Agencia de Medio ambiente del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente de Cuba, a donde se enviaron muestras de tres ejemplares de cada variedad de las especies seleccionadas al azar en la plantación, depositadas con número de identificación 1212, Serie Catasús. La evaluación se llevó a cabo por el Dr. C. Luis J. Catasús Guerra, Curador de Herbario e Investigador Titular, y miembro de la Comisión Nacional de Expertos en Taxonomía Vegetal de la Flora de la República de Cuba.

El MV fue trasladado al Laboratorio de Productos Naturales, y se procedió a la clasificación con el objetivo de eliminar el material que no reunía las condiciones óptimas para el estudio. Posteriormente, fue sometido a un proceso de desinfección, según la norma ramal de salud pública (NRSP) 309,<sup>(15)</sup> que consistió en un lavado con agua potable, inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,01 %, y posteriormente, en agua destilada. El material fue secado a la sombra durante siete días, y luego en estufa con recirculación de aire a 40 °C durante tres horas. La droga seca se trituró en un molino IKA Basic con cabezal de molienda MF 10,1; hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm.

### Diseño experimental

Para la planeación y el análisis del diseño experimental se empleó el paquete computacional Statgraphics Centurion XVIII. El estudio fue realizado de forma aleatorizada para evitar los errores sistemáticos y todos los experimentos se realizaron por triplicado. Fue prefijada la concentración al 20 % de las tinturas preparadas, por ser una mezcla hidroetanólica polar de interés para extraer los metabolitos polares que caracterizan el material, muy usada para tinturas madre y en general para esta forma farmacéutica.

El diseño Taguchi fue empleado para investigar la influencia de tres factores a cuatro niveles en el rendimiento de las tinturas: método de extracción (ME), fueron empleadas dos técnicas por ultrasonido (US) en dos tiempos de extracción y la maceración con y sin agitación, la concentración del mensturo (CM) a cuatro concentraciones diferentes expresadas en % y la variedad del MV a emplear (VarM), hojas de cuatro variedades de *M. alba*, Yu-62, Criolla, Acorazonada y Doña Betty.

El factor VarM fue valorado considerando la diversidad de variedades disponibles de moreras, que son cultivadas en Cuba. Para el factor método de extracción (ME), se evaluó maceración a la temperatura ambiental, por ser viable en laboratorios de producción que no poseen control de temperatura y el método US, aunque más costoso energéticamente, por disminuir de forma significativa el tiempo de extracción. Por último, el efecto de la concentración del mensturo (CM) usando mezclas hidroalcohólicas para incrementar la disolución de los metabolitos activos. Otros factores pueden influir en el proceso, algunos de los cuales fueron controlados como el tiempo de maceración, siete días, y el tiempo de agitación diario que fue de dos horas a intervalos.

Las variables dependientes o de salida fueron las que mejor caracterizan la eficiencia del proceso de extracción de un producto natural, con interés farmacéutico: el porcentaje de rendimiento (% Rend) y de sólidos totales (% ST).

El método Taguchi se desarrolló en cinco etapas: identificación de factores y sus niveles, selección de la matriz ortogonal adecuada, configuración de los experimentos para obtener las respuestas, determinación del principal factor de influencia, análisis y validación de los resultados. La planificación de los experimentos se realizó mediante un arreglo ortogonal L16. Para la determinación de los factores de influencia y el grado de significación, se realizó un ANOVA para detectar cualquier diferencia estadística entre las medias de las correspondientes variables de respuesta.

### Elaboración de tinturas al 20 % de las hojas de las variedades de *M. alba*

Para el diseño de Taguchi, se procedió a elaborar las tinturas al 20 %, a partir de la droga seca y molida de cada una de las cuatro variedades seleccionadas en el estudio, y etanol de producción nacional, clase A, con cuatro niveles de concentración diferentes (30, 50, 70 y 90 %); primeramente, se añadió el 90 % del mensturo, y

al final se completó el volumen requerido. Por el método de ultrasonido (US), la preparación se realizó bajo la acción de ondas ultrasónicas en dos tiempos (dos y tres horas), en un baño ultrasónico Bandelin electronic RK 52. El método de maceración se realizó por dos técnicas, sin agitación (SA) y con agitación (CA), ambas por siete días.

En todas las técnicas desarrolladas, el líquido se extrajo por decantación; el residuo se escurrió y se lavó con menstro hasta completar el volumen de tintura establecido; se dejó reposar en un recipiente cerrado durante siete días. Transcurrido el tiempo de reposo, el líquido se filtró y se envasó en frascos de color ámbar, y se conservó a 4 °C hasta la realización de los ensayos.

### Análisis de calidad de las tinturas al 20 %

Las tinturas elaboradas, siguiendo los resultados del DE, se caracterizaron mediante parámetros organolépticos, químico-físicos y químicos. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, y los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DS). Todas las evaluaciones se realizaron según establece la norma ramal de salud pública NRSP 312.<sup>(16)</sup>

Para la valoración de las características organolépticas se observó color, olor y homogeneidad. La determinación de pH se realizó en pH-meter HANNA Instruments HI 2210; el índice de refracción en un refractómetro ZUZI ABBE, modelo No.315, a temperatura de 25 °C y tolerancia de  $\pm$  0,2 °C; la densidad relativa por picnometría, empleando un micropicnómetro de 2 mL y una balanza analítica Sartorius BS 124 S, las mediciones fueron realizadas a 25 °C y expresada en g/mL.

El análisis cualitativo de la composición fitoquímica de las tinturas se desarrolló a través de un conjunto de ensayos específicos, rápidos y sencillos, estandarizados para el tamizaje fitoquímico; mientras que para la determinación del contenido de fenoles totales (CPT), se usó el método colorimétrico descrito por Makkar. Se añadió 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu a 1 mL de muestra, y se dejó reposar durante cinco minutos.

Luego, se agregaron 2,5 mL de disolución al 5 % de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), y la mezcla se dejó reposar en la oscuridad por cuarenta minutos, al término del cual, se midió la absorbancia a 725 nm. Los resultados obtenidos mediante una curva de calibración, se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/mL de tintura.<sup>(17)</sup>

### Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Con la finalidad de evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de las tinturas al 20 % de *M. alba*, se determinó el potencial reductor férrico (PRF) y la capacidad de atrapar radicales libres mediante el ensayo de decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), siguiendo el protocolo descrito por Thangaraj<sup>(17)</sup> con algunas modificaciones. Los resultados se expresaron como el valor medio de tres réplicas de las mediciones realizadas en cada procedimiento. Las determinaciones espectrofotométricas fueron realizadas en un equipo Rayleigh UV-2100.

Poder reductor férrico: 1 mL de cada muestra (diluciones 1:05, 1:10 y 1:20 de las tinturas al 20 %) fue mezclado con 2,5 mL de tampón fosfato (0,5 mol/L y pH = 7) y 2,5 mL de una disolución de ferricianuro de potasio al 1 %. La mezcla se incubó a 50 °C durante veinte minutos; se adicionaron 2,5 mL de ácido tricloroacético al 10 % m/v, y se centrifugó por diez minutos a 3 000 rpm. Parte de la solución sobrenadante (2,5 mL) fue mezclada con 2,5 mL de agua purificada y 0,5 mL de cloruro de hierro (III) al 0,1 %. Finalmente, se determinó la absorbancia a 700 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ mol/mL como equivalentes de Fe(II).

Ensayo de decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo: la capacidad de atrapar radicales libres se cuantificó por la medida de la disminución de la absorbancia del radical DPPH. A 1 mL de cada dilución de las tinturas al 20 % (1:05, 1:10 y 1:15), se les incorporó 1 mL de DPPH, y 2 mL de etanol 70 %, luego se agitó para homogenizar bien, y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante diez minutos. Finalmente, se realizó lectura de la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de inhibición del DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación (1):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

donde:

A<sub>control</sub>: absorbancia del control (DPPH en etanol).

A<sub>muestra</sub>: absorbancia de las diluciones de las tinturas.

### Análisis estadístico

El análisis de los resultados del CPT y la actividad antioxidante se realizó utilizando el paquete GraphPadPrism v9.0 (2020) para Windows. Los resultados obtenidos fueron expresados en medias con sus desviaciones estándar (DE). Se realizó un ANOVA de clasificación simple para detectar diferencias entre el CPT de las tinturas evaluadas; y

de clasificación doble con prueba de comparaciones múltiples según el test de Tukey, para determinar las diferencias estadísticas entre los valores de actividad de las diferentes tinturas y sus diluciones, así como análisis de correlación para explorar la relación entre el CPT y la actividad antioxidante por ambos métodos explorados. El nivel de significación estadística para todas las pruebas fue de 95 % ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diseño experimental

La matriz experimental del DE Taguchi con arreglo ortogonal L16 y los resultados obtenidos para cada variable respuesta, se muestran en la [tabla 1](#).

Los valores medios para la variable dependiente % Rend, muestran variabilidad con los cambios de las condiciones experimentales de las variables independientes utilizadas en el diseño experimental. Se observó una tendencia general a disminuir los porcentajes de rendimientos cuando se utilizan los porcentajes más bajos del mensturo para todas las variedades de la droga seca usada, que pueden estar asociados a la menor solubilidad de los metabolitos presentes en medio acuoso.<sup>(6)</sup>

Las tinturas preparadas presentaron % ST con buena reproducibilidad entre las muestras, avalado por los bajos valores de desviación estándar, con valores entre 1,33 y 2,90, los que se encuentran en el patrón establecido para esta forma farmacéutica que debe presentar contenidos de sólidos totales superior a 1 % (m/m).<sup>(8,12)</sup>

En la [tabla 2](#), se muestran los resultados del procesamiento de los datos mediante ANOVA. Al

analizar el efecto de los parámetros principales sobre el % Rend, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CM y entre las variedades de morera utilizadas.

Un comportamiento diferente se observó para el factor método de extracción, en el cual no se detectaron diferencias entre los métodos con las técnicas utilizadas. De los factores estudiados, solo la VarM muestra influencia en el comportamiento del % ST.

A mayor concentración del mensturo se produce un aumento significativo del rendimiento, sin diferencias notables entre los niveles de 70 y 90 %, resultado que puede explicarse teniendo en cuenta que se puede lograr una mayor solubilización de metabolitos polares a medianamente polares presentes en las hojas, lo cual coincide con el estudio de Alba y col. para la optimización de la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo.<sup>(12)</sup>

El ANOVA también mostró variabilidad significativa entre las variedades para ambas respuestas. En el caso del % Rend, no se evidencia entre las variedades Doña Betty y Acorazonada, ni entre la Criolla y la Yu-62; como se observa en la comparación múltiple de rangos de medias ([Tabla 3](#)); mientras que para el porcentaje de sólidos totales, solo se detectaron entre la variedad Acorazonada y la Criolla. Las variedades Acorazonada y Doña Betty alcanzan los mayores valores de ambas respuestas cuando se utilizan los solventes de mayor CM. Estos resultados pudieran estar relacionados con las diferencias morfológicas y genéticas entre estos pares de variedades.<sup>(18)</sup>

**Tabla 1-** Factores de entrada y de salida en matriz ortogonal L16

Nro.	Variables independientes (Factores)			Variables dependientes	
	ME	CM (%)	VarM	% Rend $\pm$ DE	% ST $\pm$ DE
1	Ultrasonido 2h	EtOH 90	Doña Betty	51,67 $\pm$ 2,21	1,76 $\pm$ 0,15
2	Ultrasonido 2h	EtOH 70	Acorazonada	41,30 $\pm$ 0,10	2,87 $\pm$ 0,27
3	Ultrasonido 2h	EtOH 50	Criolla	19,17 $\pm$ 1,90	1,33 $\pm$ 0,36
4	Ultrasonido 2h	EtOH 30	Yu-62	8,46 $\pm$ 0,60	1,53 $\pm$ 0,31
5	Ultrasonido 3h	EtOH 90	Acorazonada	37,93 $\pm$ 2,17	2,83 $\pm$ 0,15
6	Ultrasonido 3h	EtOH 70	Doña Betty	48,30 $\pm$ 0,95	1,52 $\pm$ 0,34
7	Ultrasonido 3h	EtOH 50	Yu-62	24,03 $\pm$ 1,99	2,38 $\pm$ 0,38
8	Ultrasonido 3h	EtOH 30	Criolla	15,60 $\pm$ 3,41	1,71 $\pm$ 0,09
9	Maceración SA	EtOH 90	Criolla	41,47 $\pm$ 1,39	2,10 $\pm$ 0,17
10	Maceración SA	EtOH 70	Yu-62	42,50 $\pm$ 1,35	2,55 $\pm$ 0,05
11	Maceración SA	EtOH 50	Doña Betty	42,67 $\pm$ 2,67	2,67 $\pm$ 0,14
12	Maceración SA	EtOH 30	Acorazonada	27,33 $\pm$ 6,69	2,90 $\pm$ 0,84

13	Maceración CA	EtOH 90	Yu-62	36,90 ± 2,93	1,88 ± 0,06
14	Maceración CA	EtOH 70	Criolla	28,70 ± 2,07	1,90 ± 0,22
15	Maceración CA	EtOH 50	Acorazonada	39,50 ± 2,43	2,10 ± 0,15
16	Maceración CA	EtOH 30	Doña Betty	35,03 ± 1,07	2,47 ± 0,20

**Tabla 2-** ANOVA de significación estadística de factores de entrada para el análisis del porcentaje de rendimiento y de sólidos totales de las tinturas al 20 % de *M. alba*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-Ratio	Probabilidad
<b>% Rend</b>					
A:Método	169,196	3	56,398 6	2,34	0,172 8
B:Solvente	1 050,97	3	350,324	14,54	0,00 37**
C:Variedad	845,112	3	281,704	11,69	0,006 4**
<b>Residuo</b>	144,594	6	24,099 1		
<b>Total (corregido)</b>	2 209,87	15			
<b>% ST</b>					
A:Método	0,988 044	3	0,329 348	1,50	0,308 1
B:Solvente	0,018 006 3	3	0,006 002 11	0,03	0,993 3
C:Variedad	1,729 88	3	0,576 625	2,62	0,049 4*
<b>Residual</b>	1,321 13	6	0,220 188		
<b>Total (corregido)</b>	4,057 06	15			

**Tabla 3-** Comparación de rangos de medias para las variables de salida

% Rend				% ST	
Solvente	Resultado	Variedad	Resultado	Variedad	Resultado
EtOH-30	21,61 ± 11,21 c	Criolla	26,23 ± 10,64 b	Criolla	1,76 ± 0,11 b
EtOH-50	31,34 ± 10,58 b	Yu-62	27,98 ± 13,78 b	Yu-62	2,09 ± 0,16 ab
EtOH-70	40,20 ± 7,55 a	Acorazonada	36,52 ± 6,50 a	Doña Betty	2,10 ± 0,09 ab
EtOH-90	41,99 ± 6,39 a	Doña Betty	44,42 ± 6,77 a	Acorazonada	2,68 ± 0,33 a

El efecto del método de extracción no muestra diferencias significativas para ninguna de las variables de respuesta. Se observa una mayor dispersión de los datos, cuando se utiliza el método de US, lo que pudiese estar asociado a procesos de descomposición de los metabolitos de la tintura y formación de compuestos no extraíbles durante el proceso de cavitación o incrementos de la temperatura, lo cual pudiese influir en la validación de los resultados.<sup>(19)</sup>

A partir del análisis del efecto de los factores principales sobre las variables estudiadas, y considerando las condiciones de menor consumo de recursos, se decidió elaborar las tinturas utilizando como droga seca las hojas de las variedades Acorazonada y Doña Betty, el menstuo de etanol 70 % y el método de maceración sin agitación.

### Análisis de calidad de las tinturas

En la [tabla 4](#) se describen las características organolépticas de las tinturas al 20 % de morera. El

análisis permite la evaluación inmediata del estado de la muestra, y mostró tinturas homogéneas que presentaron una coloración verde oscuro y olor característico de la especie y del alcohol. Se aprecian, además, los parámetros físico-químicos evaluados.

Los valores medios de pH, índice de refracción y densidad, presentaron buena reproducibilidad entre las muestras de cada lote producido, avalado por los bajos valores de desviación estándar, lo cual es importante para descartar la posibilidad de alteraciones en la formulación no perceptibles visualmente o problemas ocurridos durante la elaboración.<sup>(20)</sup>

Los valores de pH de ambas tinturas de *M. alba* en el rango de 7,70 a 7,84 ± 0,01 muestran un carácter básico débil, que se corresponde con la abundancia de alcaloides, de aminoácidos y aminos libres, detectadas en el tamizaje fitoquímico (tabla 4) y el alto contenido proteico reportado para las hojas de esta especie.<sup>(3,6)</sup>

**Tabla 4-** Especificaciones de calidad de las tinturas al 20 % de *M. alba*

Tintura	Características organolépticas	pH	Índice de refracción (nD)	Densidad relativa
Doña Betty	Color: verde oscuro	7,70 ± 0,01	1,365 0 ± 0,000 3	0,889 1 ± 0,000 1
	Olor: característico Homogénea			
Acorazonada	Color: verde oscuro	7,84 ± 0,01	1,364 2 ± 0,000 1	0,891 3 ± 0,000 6
	Olor: característico homogénea			

Dichos valores son superiores a los recomendados para este tipo de forma farmacéutica, por lo cual, se sugiere su ajuste para la formulación de los productos finales. Los valores del índice de refracción y la densidad de las tinturas se corresponden con el intervalo de aceptación de otras tinturas de origen natural informadas en la literatura (1,35-1,40 y 0,83-0,95, respectivamente).<sup>(21)</sup>

En la [tabla 5](#) se describen los resultados de la identificación cualitativa de los grupos de metabolitos secundarios de interés en la investigación. Resultó de gran interés, que los ensayos realizados a los extractos analizados, identificaron la presencia de las mismas familias de metabolitos en su composición, lo que demuestra la similitud en la composición fitoquímica de las dos variedades seleccionadas en el estudio; sólo se diferencia el ensayo de Shinoda, que detecta presencia de flavonoides en la tintura de Acorazonada, mientras se comporta de forma abundante para la tintura de Doña Betty.

**Tabla 5-** Composición fitoquímica de las tinturas al 20 % de dos variedades de *M. alba*

Metabolitos	Ensayo / Unidades	Doña Betty	Acorazonada
<b>Triterpenos</b>	Liebermann-	++	++
<b>Esteroides</b>	Burchard	++	++
<b>Aminoácidos y aminas libres</b>	Ninhidrina	++	++
<b>Alcaloides</b>	Wagner	++	++
<b>Fenoles</b>	Cloruro Férrico	++	++
<b>Taninos</b>		++	++
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	++	+
<b>Cumarinas</b>	Baljet	++	++
<b>Fenoles totales</b>	mg equivalentes de ácido gálico/mL de tintura	220,92 ± 0,92 <sup>b</sup>	287,51 ± 0,36 <sup>a</sup>

Leyenda: (+) Presencia; (++) Abundancia; (-) Ausencia

Es significativa la abundancia en ambas tinturas de compuestos fenólicos, alcaloides y terpenos; metabolitos secundarios que pueden estar relacionados con la actividad farmacológica

informada en la literatura para esta especie, en particular con sus propiedades antioxidantes.<sup>(3,6)</sup> Estos resultados coinciden con los informados por Martín y col. en la estación experimental “Indio Hatuey”, en la región occidental de Cuba, para diversas variedades de morera.<sup>(18)</sup>

La cuantificación del CPT mostró valores significativamente diferentes entre las tinturas, correspondiendo los mayores a la variedad Acorazonada con 287,51 mg equivalentes de ácido gálico/mL de tintura. Esta abundancia de fenoles reafirma los resultados del tamizaje fitoquímico y coincide con lo informado por Polumackanycz y col.,<sup>(22)</sup> que determinaron altos CPT en las hojas de distintas variedades de morera cultivadas en Italia, que fundamentan su potencial aplicación como nutracéutico.

En la [tabla 6](#) se muestran los resultados de la actividad antioxidante de las tinturas al 20 % de hojas de *M. alba*, a distintas diluciones, determinadas por los métodos de PRF y DPPH. Los valores del PRF aumentan con la concentración, siendo significativamente menores a la dilución 1:20 para ambas variedades. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diluciones de tinturas de diferentes variedades a un mismo nivel.

**Tabla 6-** Actividad antioxidante de las tinturas al 20 % de *M. alba*

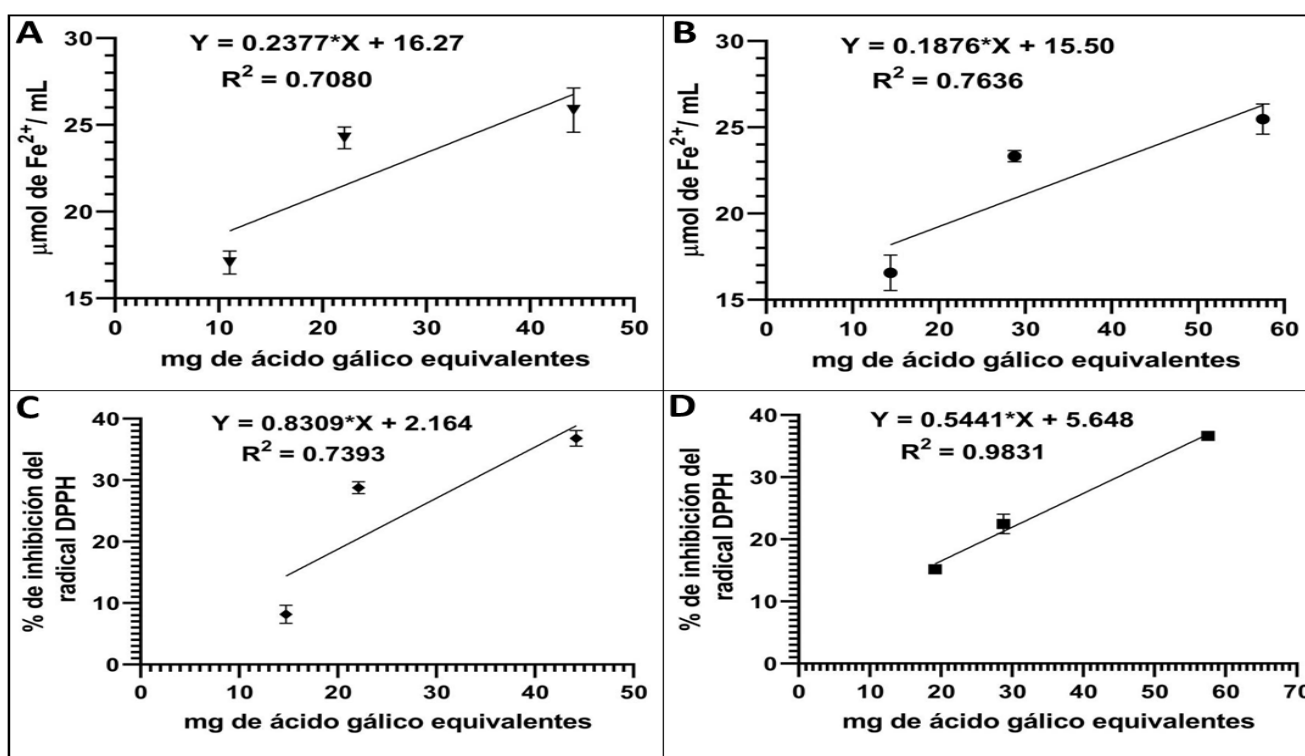
Tintura	Dilución	Doña Betty	Acorazonada
PRF	1:05	25,86 ± 1,28 <sup>a1</sup>	25,48 ± 0,88 <sup>a1</sup>
	1:10	24,25 ± 0,63 <sup>a1</sup>	23,33 ± 0,34 <sup>a1</sup>
	1:20	17,08 ± 0,70 <sup>a2</sup>	16,57 ± 1,03 <sup>a2</sup>
DPPH	1:05	36,81 ± 1,28 <sup>a1</sup>	36,64 ± 0,41 <sup>a1</sup>
	1:10	28,79 ± 0,98 <sup>a2</sup>	22,49 ± 1,55 <sup>a2</sup>
	1:15	8,20 ± 1,49 <sup>b3</sup>	18,70 ± 0,10 <sup>a3</sup>

Leyenda: letras diferentes en un mismo ensayo indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre variedades a una misma dilución. Números diferentes en un mismo ensayo indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre diluciones de una misma variedad.

Los valores del % de inhibición del radical DPPH disminuyen con la dilución de manera significativa para ambas variedades. La tintura de la variedad corazonada mostró un mejor comportamiento, al mantener un 18,7 % de inhibición a la mayor dilución ensayada (1:15), lo cual demuestra su mayor actividad antioxidante.

Estos resultados están en correspondencia con lo informado por Khan y col.,<sup>(23)</sup> los que informaron que la actividad reductora por el método del PRF en extractos metanólicos de *M. alba*, aumenta con el incremento del contenido fenólico; así como con el

estudio de Sann y col.<sup>(24)</sup> en extractos alcohólicos de hojas de esta especie, que demostró un aumento de la actividad atrapadora del radical DPPH con el aumento de la concentración. La relación de la actividad antioxidante con el contenido de fenoles presentes en las plantas ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, siendo demostrado que existe una relación directa entre estos parámetros,<sup>(6,22)</sup> por lo que en esta investigación se realizó un análisis con la finalidad de determinar la relación entre el CPT y la actividad antioxidante de las tinturas al 20 % de *M. alba* elaboradas, cuyos resultados se muestran en la [figura 1](#).



**Fig. 1-** Análisis de correlación entre la concentración de fenoles y la actividad antioxidante de las tinturas de *M. alba* al 20 %

Leyenda: A- Poder reductor férrico de la variedad Doña Betty; B- Poder reductor férrico de la variedad Acorazonada; C- Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la variedad Doña Betty; D- Porcentaje de inhibición del radical DPPH de la variedad Acorazonada.

La relación existente entre el PRF y el CPT para las tinturas de las dos variedades en estudio (gráficos A y B) es débil, lo que se evidencia por valores de  $R^2$  menores de 0,8. Este resultado indica que el PRF está condicionado por los fenoles presentes en la tintura y, además, por otros metabolitos secundarios que inciden en este mecanismo de acción, o que puede haber interferencia de otros compuestos.

La actividad antirradicalaria de la tintura de la variedad Doña Betty mostró en relación con el CPT un comportamiento similar al de PRF. Por otro lado, se observó un alto índice de correlación ( $R^2 = 0,9831$ ) entre los valores de DPPH y el contenido de fenoles presentes en la tintura de la variedad Acorazonada.

<https://cubanadequimica.uo.edu.cu/index.php/cq>

ISSN: 2224-4521

Polumackanycz y col.<sup>(25)</sup> plantearon, que las relaciones entre el CPT y las actividades reductora y atrapadora de radicales libres, se comportan de manera diferente para extractos polares de las hojas de morera: fuertemente positiva para el contenido de ácidos fenólicos, y moderadamente negativa para el contenido de flavonoides. Estos resultados evidencian la contribución a la actividad antioxidante de otras familias de metabolitos, como las vitaminas, antocianinas y carotenoides presentes en los extractos de hojas de *M. alba*.

Los valores de  $R^2$  observados en el análisis de correlación del presente estudio, pudieran estar influenciados por la abundancia en estas muestras



de terpenos, esteroides, alcaloides y aminos detectadas en el tamizaje fitoquímico. En este ensayo se detectó solo presencia de flavonoides en la tintura de la variedad Acorazonada, lo cual pudiese explicar su mejor correlación entre el CPT y los resultados del DPPH con respecto a la variedad Doña Betty.

## CONCLUSIONES

Los resultados del diseño experimental aplicado, permitieron establecer las condiciones más favorables para la elaboración de tinturas al 20 % de hojas de *M. alba*, como droga seca, el uso de las hojas de las variedades Doña Betty o Acorazonada indistintamente, mensturo de etanol al 70 % y la maceración como método de extracción. La calidad de las tinturas fue evaluada a través de parámetros organolépticos, químico-físicos y químicos. Se detectó en los productos elaborados abundancia de triterpenos y esteroides, aminoácidos y aminos libres, alcaloides, fenoles y taninos, cumarinas y flavonoides. La variedad Acorazonada mostró mayor contenido de fenoles totales, superior actividad antirradicalaria y mejor correlación entre estos parámetros. Los altos valores del contenido de fenoles totales encontrados en las tinturas fundamentan la actividad antioxidante y su potencial aplicación como nutraceutico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NIAZI, P.; MONIB, A. W. "The role of plants in traditional and modern medicine". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2024, **13**(2), 643-647. DOI: <https://doi.org/10.22271/phyto.2024.v13.i2d.14905>
2. CALDERÓN-PEÑA, A.; ASPAJO-VILLALAZ, C.; PRETEL-SEVILLANO, O. "Estrés oxidativo y especies reactivas". *REBIOL*. 2018, **38**(2), 53-65. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2276>
3. RODRIGUES, E. L. *et al.* "Nutraceutical and medicinal potential of the *Morus* species in metabolic dysfunctions". *Int. J. Mol. Sci.* 2019, **20**(2), 301. Disponible en: [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Int.+J.+Mol.+Sci.+2019%2C+20%282%29%2C+301.&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Int.+J.+Mol.+Sci.+2019%2C+20%282%29%2C+301.&btnG=)
4. FATIMA, M. *et al.* "Biosynthesis and Pharmacological Activities of the Bioactive

Compounds of White Mulberry (*Morus alba*): Current Paradigms and Future Challenges". *Biology*. 2024, **13**, 506. <https://doi.org/10.3390/biology13070506>

5. ZHOU, Q. Y. J.; LIAO, X.; KUANG, H. M.; LI, J. Y.; ZHANG, S. H. "LC-MS Metabolite Profiling and the Hypoglycemic Activity of *Morus alba* L." *Extracts. Molecules*. 2022, **27**, 5360. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27175360>

Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/17/5360>

6. DIZDAREVIC, M.; MESIC, A.; JERKOVIC-MUJKIC, A.; ZUJO, B.; AVDIC, M.; HUKIC, M.; *et al.* "Biological potential, chemical profiling, and molecular docking study of *Morus alba* L. extracts." *Fitoterapia*, 2024; **177**, 106114. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.106114>

7. GURNI, A. A. "Factores que influyen en los parámetros de control de calidad de las plantas medicinales". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2007; **6**(5):166. ISSN: 0717-7917. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85617508016.pdf>

8. OLIMOV, N.; SIDAMETOVA, Z. "Creation and development of technology of tincture from sedative collection of □Flegmen□". *World J Pharm Sci*, 2019; **7**(8): 42-46. Disponible en: <https://wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/tincture-sedative-collection-flegmen>

9. FERNÁNDEZ, E. G. N.; FERNÁNDEZ, M. C. "Experimental designs in pharmaceutical technology and control of medicaments". *Lat. Am. J. Pharm.* 2008; **27**(2):286-296. ISSN: 0326-2383. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57939206.pdf>

10. PÉREZ-LÓPEZ, D. J. *et al.* "Diseño de experimentos factoriales 2n para su análisis con Infostat e Infogen". *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, 2021; **12**(6):1087-1099. ISSN 2007-0934. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342021000601087&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342021000601087&script=sci_arttext)

11. JIMÉNEZ, J. *et al.* "Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive". *Chemical Engineering Journal*. 2015; **259**: 703-714. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.031>

12. ALBA DE ARMAS, M. A. *et al.* "Optimización de la tecnología de elaboración de la tintura de propóleo". *Rev Centro Azúcar*. 2022; **49**(3):69-77. ISSN 0253-5777. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2223-48612022000300069&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2223-48612022000300069&script=sci_arttext)

13. NARANJO-PALACIOS, F.; RÍOS-LIRA A. J.; PANTOJA-PACHECO, Y. V.; TAPIA-ESQUIVIAS, M. "Diseños ortogonales de Taguchi fraccionados". *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 2020; **XXI**(2): 1-12. ISSN 2594-0732. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8263454>
14. WANG, S.; SU, T.; YE, J.; LO, L. "Application of Taguchi Method in the optimization of the antioxidant activity for Australian Tea Tree". *Applied Mechanics and Materials*. 2014; **595**:253-257. Disponible en: <https://www.scientific.net/AMM.595.253>
15. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. Norma Ramal de Salud Pública No. 309. *Medicamentos de origen vegetal: droga cruda. Métodos de ensayos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1992.
16. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. Norma Ramal de Salud Pública 312. *Medicamentos de origen vegetal: Extractos y Tinturas. Métodos de ensayo*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1991.
17. THANGARAJ, P. *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*. Cham (Suiza): Springer International Publishing; 2016. ISBN 978-3-319-26810-1
18. MARTÍN, M. G. J. *et al.* "Morus alba, L., una planta multipropósito para la producción animal en Cuba". *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 2017; **7**(1), 1-12. Disponible en: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/466>
19. RAMÓN, C.; GIL-GARZÓN, M. A. "Efecto de los parámetros de operación de la extracción asistida por ultrasonido en la obtención de polifenoles de uva: una revisión". *TecnoLógicas*. 2021, **24**(51), e1822. Disponible en: <https://doi.org/10.22430/22565337.1822>
20. Da SILVA, I. P.; LINS, F. A.; COSTA, L. dos S.; SOBREIRA, A. L. de C.; De SOUZA, J. B. "P. Jatoba tincture (*Hymenaea* sp.): physico-chemical aspects of quality and assessment of antimicrobial activity". *Research, Society and Development*, 2022. Supl 1, **11**(6), e11111628865, DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28865>. Disponible en: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/28865>
21. CRUZ, D. *Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos*. Vol. 2, Editorial Ciencias médicas, Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, La Habana, 2017. Disponible en: <https://instituciones.sld.cu/cimeq/2018/01/09/formulario-nacional-defitofarmacos-y-apifarmacos-segunda-edicion-ano-2017/>
22. POLUMACKANYCZ, M.; WESOŁOWSKI, M.; VIAPIANA, A. "Morus alba L. and Morus nigra L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity". *Plant Foods for Human Nutrition*, 2021; **76**(4):458-465. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-021-00922-7>
23. KHAN, M. A. *et al.* "A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of Morus alba L. (Moraceae)". *BioMedCentral*. 2013; **6**(1-9). Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/1756-0500-6-24>
24. SANN, E. E; SOE, M. M.; KHINE, M. M. "Isolation and identification of some phytoconstituents from leaves of Morus alba L. and screening of antioxidant activity". *J. Myanmar Acad. Arts Sci.* 2020, **18**(1A) Disponible en: [http://maas.edu.mm/Research/Admin/pdf/35.%20Dr%20Ei%20Ei%20Sann\(401-408\).pdf](http://maas.edu.mm/Research/Admin/pdf/35.%20Dr%20Ei%20Ei%20Sann(401-408).pdf)
25. POLUMACKANYCZ, M.; SLEDZINSKI, T.; GOYKE, E.; WESOŁOWSKI, M.; VIAPIANA, A. A. "Comparative Study on the Phenolic Composition and Biological Activities of Morus alba L. Commercial Samples". *Molecules*, 2019, **24**, 3082. <https://doi.org/10.3390/molecules24173082>

## DECLARACIÓN CONFLICTO DE INTERESES

No se declaran conflictos entre los autores

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Dr. C. Quirino Arias Cedeño: concepción de investigación, escritura y revisión final de artículo.

M. Sc. Lázaro Eduardo Valdés Izaguirre: adquisición e interpretación de datos y escritura.

M. Sc. Doralis Romero Guerra: adquisición e interpretación de datos.

M. Sc. Beltis Villalona Pons: adquisición e interpretación de datos.

Dr. C. Yans Guardia Puebla: análisis e interpretación de datos.